

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III

(Medicina y Cirugía Bucofacial)



TESIS DOCTORAL

**Comportamiento de la superficie de implantes Straumann SLActive®
y SLA® en el hueso de la tibia del conejo neozelandés**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Hernández de Oliveira

Directores

Luis Aracil Kessler

José Vicente Sanz Casado

José Luis López Lacomba

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA III

(MEDICINA Y CIRUGÍA BUCOFACIAL)

TESIS DOCTORAL



**COMPORTAMIENTO DE LA SUPERFICIE
DE IMPLANTES STRAUMANN SLACTIVE®
Y SLA® EN EL HUESO DE LA TIBIA DEL
CONEJO NEOZELANDÉS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Marta Hernández de Oliveira

Directores:

Luis Aracil Kessler

José Vicente Sanz Casado

José Luis López Lacomba

ISBN:

Madrid, 2015

© Marta Hernández de Oliveira, 2015

A mi madre

Agradecimientos

Me resulta difícil expresar en pocas palabras la suerte que he tenido de vivir estos años de trabajo científico. Ahora ha llegado el momento de dar las gracias, de nuevo, a todas las personas que me han ayudado durante este tiempo.

En primer lugar quería darle las gracias a mis directores de tesis los Dres. Luis Aracil Kessler y José Vicente Sanz por la confianza que han depositado en mí al embarcarme en este proyecto tan especial y del que tanto he aprendido.

De forma muy especial quiero agradecerle al Dr. José Luis López Lacomba por su pacencia a mis constantes preguntas y por ayudarme a guardar y organizar el trabajo.

También quiero expresar mi agradecimiento a Fernando Muñoz por responder una y otra vez a mis correos y mensajes y orientarme en gran parte del trabajo.

En particular muchas gracias a mi madre Adelina por todo el apoyo que me brinda de forma desinteresada en cada momento.

A mis tíos Ángeles y Gerardo por cuidar de mis pequeños mientras terminaba el trabajo y animarme una y otra vez.

A mi primo Álvaro por echarme una mano informática cada segundo.

A mi marido Pablo y a mis hijos Marta y Pablo por haberme hecho más fácil este recorrido y haber compartido conmigo momentos de desánimo y alegría.

Índice

I.	Resumen en inglés/ Summary	6-10
II.	Resumen	11-12
III.	Trabajo de investigación	13-77
1.	Introducción	13
- 1.1.	Generalidades -	13-14
1.2.	Osteointegración	
1.2.1.	Definición	14-15
1.2.2.	Proceso de osteointegración	15-17
1.2.3.	Factores que influyen en la osteointegración	17-26
1.2.4.	Diagnóstico de la osteointegración	27-29
- 1.3.	Desarrollo de la nueva superficie SActive: revisión de la bibliografía	29-34
2.	Justificación e Hipótesis	35
3.	Material y Método	35
- 3.1.	Consentimiento del comité ético para investigación en animales	36
- 3.2.	Selección del animal de experimentación	36-37
- 3.3.	Selección de los implantes	38
- 3.4.	Procedimiento quirúrgico	39-40
- 3.5.	Sacrificio de los animales	40-41
- 3.6.	Valoración de la estabilidad primaria y secundaria	41-42
- 3.7.	Procesado de las muestras y valoración histomorfométrica	42-48
- 3.8.	Análisis estadístico	49

4. Resultados	50-62
- 4.1. Descripción de la muestra	53
- 4.2. Análisis global de los resultados	53-54
- 4.3. Análisis de los resultados histomorfométricos (BIC%. Porcentaje de contacto hueso implante)	54-56
- 4.4. Análisis de los resultados de estabilidad (ISQ Implant stability Quotient)	57-62
5. Discusión	63
- 5.1. Diseño y metodología del estudio	63
5.1.1. Animal de experimentación	63-64
5.1.2. Selección de los implantes	65
5.1.3. Implante SLA/SLActive	65-67
5.1.4 Selección de tiempos de sacrificio	67-68
5.1.5 Pruebas histológicas e histomorfométricas	68
5.1.6 Diseño y metodología del estudio	69-70
- 5.2 Interpretación de los resultados	70-74
5.2.1. Estabilidad de los implantes	70-72
5.2.2. Histomorfometría BIC	72-74
6. Conclusiones	75-76
7. Limitaciones del estudio	77
8. Referencias bibliográficas	78-94

Resumen en inglés / Summary

Introduction

The implant surface has been recognized to be a critical factor for the achievement of osseointegration. The most important surface properties are topography, chemistry, surface charge and wettability. Surface properties affect processes such as protein adsorption, cell-surface interaction, and cell/tissue development at the interface between the body and the biomaterial, all of which are relevant to the functionality of the device. In the past 20 years, the topography of titanium surfaces has been investigated for dental implant applications. The SLA surface (sandblasted and acid-etched) demonstrate enhanced bone apposition in histomorphometric studies and higher removal torque values in biomechanical testing. Based on these experimental results, clinical studies were initiated to load SLA implants after a reduced healing period of only 6 weeks. The clinical examination up to three years demonstrated favorable results, with success rates around 99%.

Beside surface topography, surface chemistry is another key variable for peri-implant bone apposition, since it influences surface charge and wettability. Surface wettability is dependent on surface energy and influences the degree of contact with the physiologic environment. Increased wettability and surface free energy, both have a positive influence on bone apposition.

The purpose of this study was to evaluate the degree of bone apposition with the chemically modified SLActive® surface versus the SLA® surface in the rabbit tibia, which has the same micro- and macrotopography, but differ in their surface chemistry due to different production protocols. The hypothesis of these study was that the

SLActive surface would promote a faster bone apposition in comparison with the standard SLA surface.

Material and Methods

Implant design and surface characterization

All implants were manufactured from commercially pure titanium, cylindrical shape, diameter from 3,3 mm and eight mm long (Institut Starumann AG, Waldenburg, Switzerland). The control implant had the standard SLA surface (sandblasted with large grits of 0,25 to 0,50 mm and acid etched with HCl/H₂ SO₄) and the experimental had the SLActive surface, which were produced with the same sandblasting and acid-etching procedure but rinsed under N₂ protection and continuously stored in an isotonic NaCl solution and with different chemical properties. SLA® and SLActive® implants were placed in the rabbit tibia, each in one of them.

Surgical procedure

The current study protocol was approved by the committee for animal research, (comité ético para la investigación animal) at the Universidad Complutense de Madrid.

There were thirtysix implants placed in eighteen tibias of nine animals according to a low-trauma surgical technique. The implants were placed, with good primary stability provided by the press-fit of the implants with the bone walls of the prepared implant beds. In each animal 4 implants were placed, two SLActive and two SLA. On the right tibias SLActive implants were placed and on the left SLA.

Stability measurements were realized with the Ostell® System (RFA Resonance Frequency Anlysis) developed and verified by the investigation group from Meredith.

On each implant stability values were measured at time of implant insertion to define primary stability. Secondary stability were measured after 7, 14 and 28 days immediately after sacrifice.

Histological preparation and histomorphometric analysis

Three rabbits were selected to be sacrificed at day 7, 14 and 28 after implant insertion. Unfortunately two rabbits died, so that for day 7 and 14 only two rabbits survived. Immediately following death, the soft tissues were removed to expose the area with the implants. In each animal, 4 blocks from each implant were produced with an oscillating saw. The block specimens were dehydrated and embedded in methylmetacrylate. The sections were glued with acrylic cement and ground to a final thickness of 80 µm and stained with Levai-Laczo solution. One specimen of each implant were analyzed by an experienced examiner. We determined the percentage of direct contact between mineralized bone and the titanium surface by intersection counting.

Results

Evidence showed that the amount of percentage of bone to implant contact BIC was significantly greater with SLActive® after two weeks of healing. At day 14, the BIC on SLActive® was significantly greater (38,95% (SD 2,49) versus 29,84% (SD 4,78); $p \leq 0,05$). At day 28 weeks, the BIC for SLActive® was 41,54% (SD 5,46) compared to 32,53 (SD 9,6) ($p < 0.05$) for SLA®. SLActive® showed in all results better values and statistically significant difference at day 14.

The stability values ISQ were for both surfaces in all moments similar, except on day 7 where the difference was significantly greater on implants with the SLActive surface.

Discussion

In the past twenty years a large number of studies have examined the effect of the chemically modified implant surface SLActive. All of them has demonstrate that this chemical modification that provide a hydrophilic behaviour enhance the bone apposition in the early stages of bone healing.

In the current study, the test surface demonstrate a significantly greater bone-to-implant contact at two weeks of healing of healing as compared with the standard SLA surface. At day 7 and 28 there were also differences but not statistically significant.

It was observed that continuous submersion of an implant surface in isotonic solution appears to protect the pure titanium surface from contamination with carbonates and organic components naturally occurring in the atmosphere, thus preserving a chemically clean and reactive surface. Rupp showed in his study that SLActive® is highly hydrophilic (water contact angle of 139.9° versus 0° for SLA®) and present a reduced atmospheric contamination and a higher surface free energy. Schwarz concluded that soft and hard tissue integration was influenced mainly by surface hydrophilicity rather than microtopography.

Bornstein observed in his study in the dog a pronounced increase of bone formation around SLActive® compared to SLA® on the second week of implant integration.

Schwarz showed in his studies in the dog significantly increased proliferation of vascular structures throughout days 1–14 and an increased activity of osteocalcin at the bone-to-implant interface. Also the bone to implant contact values were higher in the early stages of healing on the SLActive surface.

As in the aforementioned studies the histomorphometric results of our study showed that the bone to implant contact values are higher in the SLActive surface implants in

all the analysed moments, but only on day 14 the difference were statitically different.

Valderrama et al. observed a significant improvement in the stability pattern with SLActive® specially at an earlier stage (break point after 2 weeks with SLActive® versus 4 weeks with SLA®).

In our study stability values ISQ were for both surfaces in all moments (7, 14, 28 days) similar, except on day 7 where the difference was significantly greater on implants with the SLActive surface. That matches with the results reported from Valderrama where the stability values at the early stage higher were.

Resumen en castellano

Introducción

La superficie rugosa SLA® (Sand-blasted, Large-grit, Acid-etched) ha demostrado tener una buena osteointegración. Sin embargo se ha demostrado que las superficies químicamente modificadas pueden mejorar los valores de porcentaje de contacto hueso implante BIC. El aumento de humectancia y la energía libre superficial ha mostrado influir positivamente en la neoformación de tejido óseo. El objetivo del estudio es evaluar la osteointegración de los implantes con superficie SLA® y SLActive® con una topografía idéntica, pero propiedades químicas superficiales diferentes.

Material y Método

Se colocaron implantes con superficie SLA® (control) y SLActive® (experimental) en el hueso de la tibia del conejo. Se colocaron un total de treinta y seis implantes en nueve animales, dieciocho implantes SLA® y dieciocho SLActive®. Cada conejo recibía cuatro implantes, dos implantes control y dos experimentales. En todos los implantes se midió la estabilidad primaria en el momento de la inserción del implante con el sistema de Ostell Mentor (Análisis de frecuencia resonancia). Se sacrificó un grupo de animales a los siete días de osteointegración, otro grupo a los catorce días y un tercer grupo a los 28 días. En este momento se volvió a medir la estabilidad. Todos ellos se prepararon para obtener las muestras histológicas y realizar las mediciones histomorfométricas y obtener los resultados de porcentaje de contacto hueso-implante.

Resultados

Los resultados de porcentaje de contacto hueso-implante fueron significativamente mayores para la superficie SLActive a las dos semanas de osteointegración (38,95 por ciento (desviación estándar SD 2,49) versus 29,84 por ciento (desviación estándar SD 4,78; p menor igual que 0,05). A las tres semanas el valor de porcentaje de contacto hueso implante BIC para SLActive® fue de 41,54 por ciento (desviación estándar SD 5,46) frente a 32,53 por ciento (desviación estándar SD 9,6) (p menor que 0.05) de SLA®. SLActive® presentó mejores resultados en todos los momentos siendo estadísticamente significativos en el día catorce. Los valores de estabilidad ISQ fueron muy similares en todos los momentos, aunque en el día siete la diferencia fue estadísticamente significativa a favor de la superficie SLActive.

1. Introducción

1.1. Generalidades

Actualmente la utilización de implantes intraóseos para la rehabilitación completa o parcial del paciente desdentado ha pasado a ser un tratamiento estándar en las consultas de odontología. A lo largo de las últimas décadas, la implantología, como rama de la odontología ha sufrido cambios muy notorios que han influido de forma significativa en el tratamiento de las patologías orales. El incremento de la terapéutica implantológica ha convertido los tratamientos restauradores en procedimientos quirúrgicos y protésicos complejos (1).

Esta evolución se ha basado en el concepto de osteointegración descrita por primera vez por los dos grupos de investigación liderados por Branemark y Schroeder (2,3).

En los últimos 15 años la eficacia y predictibilidad de los implantes osteointegrados han sido documentados en numerosos estudios prospectivos (4).

Los estudios clínicos prospectivos han demostrado unas tasas de supervivencia y de éxito claramente superiores al 90% después de 10 años de seguimiento (5).

A finales de los años 80 se iniciaron los estudios para evaluar diferentes superficies de titanio rugosas. El objetivo era desarrollar superficies rugosas con mejor osteointegración. Al principio de los 80 las superficies rugosas que se desarrollaron fueron superficies rugosas producidas por adición de partículas de Titanio como la superficie TPS (Titanium Plasma-Spray). Posteriormente, con el fin de que no hubiese problemas de desprendimiento de partículas se desarrollaron superficies rugosas que se creaban a base de chorrearlas con arena y sumergirlas en un medio ácido. De ahí surgió la superficie SLA (Sand-blasted, Large-grit, Acid-etched). Un estudio histomorfométrico de Buser y cols. evaluaba el comportamiento de 5 superficies de titanio diferentes en

hueso de mini-pigs donde se demostró que la unión entre el hueso y el implante era mayor en superficies rugosas de sustracción que en superficies de adición. (6)

La optimización y modificación en los materiales tanto desde el punto de vista macroscópico como microscópico han mejorado la cicatrización ósea en la calidad como en el tiempo. Los objetivos actuales en el tratamiento con implantes es devolver la función masticatoria y estética en el tiempo más corto posible con un buen pronóstico a largo plazo. Para conseguir este objetivo es necesario conseguir una unión fuerte y estable entre el tejido óseo y el implante, unión que denominamos osteointegración.

1.2 Osteointegración

1.2.1 Definición

Al comienzo de los años 60 Branemark y colaboradores describieron una unión directa estructural y funcional entre el hueso colindante del implante y su superficie que denominaron osteointegración y que así divulgaron (7).

Basado en este concepto y estudiándolo bajo microscopía electrónica la osteointegración se redefinió como el contacto directo hueso implante (8).

En el mismo momento el grupo de investigadores de Schroeder y colaboradores demuestran mediante el estudio histológico una unión calcificada entre el hueso y el implante sin tejido epitelial ni conectivo interpuesto. Este grupo consiguió hacer cortes histológicos de las muestras con técnicas de laboratorio muy precisas sin que la interfase entre el hueso y el implante se separase o desmoronase (9). Con el tiempo el número de implantes estudiados iba aumentando generosamente incluyendo los

implantes colocados en humanos que demostraron la supervivencia a largo plazo y una vez cargados y haciendo su función masticatoria. De esta manera el concepto de osteointegración y de anquilosis funcional se unificó (10). En los años 90 el grupo de Albrektsson y cols redefinieron el concepto de osteointegración, ya que el contacto hueso implante desde el punto de vista histológico nunca era del 100% y tampoco podía determinarse un porcentaje exacto que correspondiera al éxito de la osteointegración desde el punto de vista clínico. Por eso la nueva definición se basó en la estabilidad estática y funcional: „Proceso en el que existe una fijación rígida en el hueso clínicamente asintomática y que se mantiene durante la función“ (11).

1.2.2 Proceso de osteointegración

El proceso de osteointegración es un proceso normal de osificación que se divide en tres fases de cicatrización: la formación de tejido osteoide, la mineralización y maduración. Tras la incisión, preparación del lecho implantario y colocación del implante se produce durante las dos primeras horas la formación de un coágulo con eritrocitos, neutrófilos y macrófagos inmersos en una red de fibrina en la interfase entre implante y hueso. Poco a poco el coágulo se va reabsorbiendo y tras cuatro días se va sustituyendo por células mesenquimales rodeadas de fibrina y estructuras vasculares. En la zona directa al implante se encuentran numerosas células inflamatorias, mientras que en zonas más alejadas del implante no las hay (12). Debido a la “presión de ajuste” ó „Press fit“ se obtiene una estabilidad primaria inicial del implante que en huesos muy corticales y duros se traduce en zonas de isquemia por elevada compresión que provoca

hipoxia y pérdida de osteocitos vitales, tejidos necróticos que deben ser reabsorbidos (13, 14, 15).

La hipoxia local que se produce provoca la liberación de numerosos factores de crecimiento como p.ej. el factor de crecimiento vascular endotelial “vascular endothelial growth factor (VEGF)” (16). A través de los nuevos capilares se produce la llegada de neutrófilos, macrófagos y otros muchos factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformador β “transforming growth factor β (TGF- β)”, la proteína morfogenética “bone morphogenic protein 2 (BMP-2)”, el factor de crecimiento de fibroblastos “fibroblast growth factor (FGF)”, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas “platelet derived growth factor (PDGF)” y el factor de crecimiento de insulina “insulin-like growth factor (IGF)” (17). Tras la cicatrización primaria se produce la osteoinducción y osteoconducción. Una semana tras la implantación se reconoce sobre la superficie del implante una estructura inicial compuesta por fibras de colágeno y capilares rodeados por células inflamatorias. Pasadas dos semanas empieza a reconocerse tejido osteoide compuesto de osteoblastos y osteocitos sobre la superficie del implante incluso en las zonas apicales del implante (18). Los osteoblastos se forman gracias a que los factores de crecimiento estimulan a las células mesenquimales de la zona circundante para que se conviertan en células creadores de tejido óseo (19). Los osteoblastos sintetizan tejido osteoide que posteriormente se calcificará. Se diferencian así la osteogenesis a distancia y la de contacto (20). Tras cuatro semanas las espiras se rellenan de hueso esponjoso primario rico en capilares y células parecidas a los fibroblastos. Este hueso primario se reorganiza en las siguientes semanas por cambios de presión y se convierte en hueso secundario en el que aparecen haces de colágeno organizados con una medular compuesta por células grasas, capilares sanguíneos y células mononucleares (21, 22).

A partir de aquí el hueso se va remodelando y adaptando durante el resto de la vida según los estímulos que reciba (23).

1.2.3 Factores que influyen en la osteointegración

Para la osteointegración con éxito se necesita:

- a) Material biocompatible seguro
- b) Tipo de tejido óseo
- c) Diseño del implante indicado
- d) Superficie del implante correcta
- e) Cirugía cuidadosa y bien planificada
- f) Buena estabilidad primaria
- g) Tiempo prudencial de osteointegración individualizado para dejar que se produzca una correcta estabilidad secundaria.

a) Material biocompatible



Fig. 1 Titanio

El implante debe estar fabricado de un material de base biocompatible. El elemento químico utilizado como primera elección en la fabricación de implantes dentales es el titanio. Está ordenado en la tabla periódica en posición 22 con un peso atómico de 47,9 y un punto de fusión de 1668° con una baja densidad de 4,5 g/cm³. El titanio se caracteriza por una conductividad térmica muy baja asegurando los tejidos de estímulos térmicos nocivos. El titanio es un metal no noble lo que le confiere la propiedad de ser muy reactivo. Por ello en cuanto entra en contacto con el oxígeno su superficie se oxida y se mantiene así protegida de corrosión y de disolución. Esta propiedad química lo convierte en un material muy biocompatible (24, 25). El titanio y sus aleaciones pertenecen al grupo de materiales bioinertes (26). El Titanio comercialmente puro tiene diversos grados de pureza graduados de 1 a 4. Esta pureza se caracteriza por el contenido de Oxígeno, Carbono y Hierro. La mayoría de los implantes dentales presentan un grado 4 por sus buenas propiedades mecánicas, haciéndolo particularmente relevante y adecuado para aplicaciones biomédicas.



Fig. 2 Implantes Straumann Bone Level y Tissue Level

Los implantes Straumann de superficie SLA se caracterizan por estar compuestos por Titanio tipo IV. Están chorreados con arena y grabados con ácido para aumentar la

superficie de osteointegración. En la confección de implantes de titanio se utiliza o bien de titanio comercialmente puro, una aleación compuesta por Titanio, aluminio y Vanadio (Ti-6Al-4V contiene 6% Aluminio y 4% de Vanadio ISO 5832-3 (1996) ó aleaciones de Titanio con Dióxido de zirconio (Aleación Ti-Zr1317 con 13-17% de Zirconio, Roxoild[®] Straumann Implant) le proporciona propiedades de mayor resistencia a la tracción (27, 28, 29, 30, 31).

Algunos estudios también han demostrado que el Tantal, Niobium y el dióxido de zirconio obtienen buenos resultados en la osteointegración (25, 26).

b) Tipo de tejido óseo

El hueso cortical y el trabecular están formados por las mismas células y la misma matriz pero existen diferencias estructurales y funcionales entre ambos. La primera diferencia estructural es cuantitativa: entre el 80%-90% del volumen en el hueso cortical está mineralizado mientras que en el trabecular solo el 15- 25% está calcificado. Esto nos lleva a una diferencia funcional: el hueso cortical lleva a cabo funciones mecánicas y de protección, mientras que el hueso trabecular participa fundamentalmente en las funciones metabólicas. En el análisis histológico del esqueleto del individuo adulto se observa que el 80% del volumen total del hueso está formado por hueso cortical o compacto que, es el principal responsable de la integridad mecánica. El 20% restante del volumen es hueso trabecular o esponjoso que es fundamental para las demandas metabólicas.

El hueso cortical tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados canales de Havers, que se extienden longitudinalmente. Los canales de Havers están conectados entre sí por otros canales llamados canales de Volkmann que perforan el periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse a lo largo del hueso. Entre las láminas

concéntricas de matriz mineralizada existen pequeños orificios ó lagunas donde se encuentran los osteocitos.

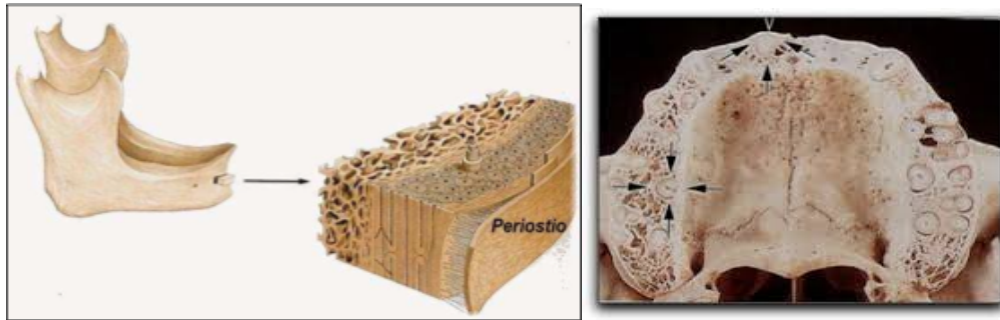


Figura 3: Esquema morfológico de una sección de hueso mandibular donde se observa la gran cantidad de hueso cortical.

Figura 4 : Corte transversal del maxilar superior donde se observa la cantidad de hueso esponjoso

Estas células intercambian nutrientes con el líquido intersticial a través de una serie de canalículos por donde se extienden prolongaciones celulares citoplasmáticas. Los canalículos están conectados entre sí y, eventualmente a los canales de Havers. El conjunto formado por el canal de Havers, las láminas concéntricas que lo rodean, las lagunas, los canalículos y los osteocitos recibe el nombre de osteona ó sistema de Havers. Las restantes láminas entre osteonas se llaman láminas intersticiales.

A diferencia del hueso compacto, el hueso trabecular o esponjoso no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas. Estos tabiques forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de médula ósea. Dentro de las trabéculas están los osteocitos que yacen en sus lagunas con canalículos que irradian desde las mismas. En este caso, los vasos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos. El hueso esponjoso es el principal

constituyente de las epífisis de los huesos largos y del interior de la mayoría de los huesos planos. Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral (32).

El estudio en humanos publicado por Sim y Lang en 2010 describe factores que pueden dar resultados de estabilidad diferentes durante la osteointegración. Hace hincapié en el tipo de hueso basándose en la calificación de Lekholm y Zarb. Diferencia huesos más corticales y esponjosos y observa que la estabilidad de los implantes viene influenciada por el tipo de hueso. Se observan valores de estabilidad primaria en hueso tipo II (bastante cortical) de 74 y para hueso tipo III/IV (esponjoso) de 56. Son valores de estabilidad más bajos en huesos menos densos. Concluye que los valores de estabilidad varían de predominantemente por la densidad ósea y en menor medida por la longitud del implante. Incrementos de los valores de estabilidad ISQ se muestran en mayor medida cuando el tipo de hueso es de poca densidad (tipo III y IV) (33).

c) Diseño geométrico del implante

El diseño y la geometría se ha estudiado de numerosas formas. Los implantes en lámina o huecos no presentaban siempre una tasa buena de osteointegración (34, 35).

Hoy en día se desarrollan principalmente implantes cónicos y cilíndricos con espiras a lo largo de la superficie (5).

d) Superficie del implante

La superficie SLA[®] de Straumann tiene una estructura compleja. Está chorreada con arena de grano grueso Corindón (250–500 μm), lo que da lugar a una macrorugosidad entre crestas de aproximadamente 20–40 μm , seguida por una microrugosidad de aprox. 2–4 μm con el grabado al ácido. Las superficies microrugosas aumentan el índice de dispersión celular y el número de células adheridas a la superficie, al tiempo que incrementan el índice de células productoras de factores reguladores de diferenciación de las células formadoras del hueso (osteoblastos), y reducen la actividad de las células destructoras del hueso (osteoclastos) (5).

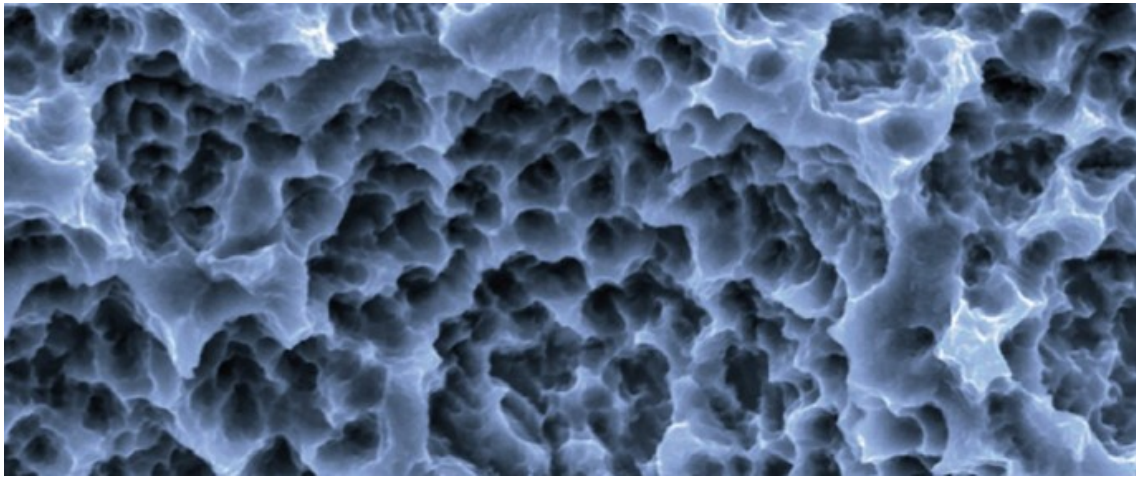


Fig. 5 Aspecto microscópico de la superficie SLA[®]

Muchos estudios se han centrado en la optimización de las superficies de los implantes. La superficie de los implantes se clasifican de forma general según las características topográficas y químicas (25). Desde el punto de vista topográfico lo que se crea sobre la superficie son macro y microrugosidades mediante grabado ácido, revestidas con spray de plasma de titanio y chorreado con arena (39, 40, 41). Al aumentar la superficie de contacto del implante se produce un aumento de la resistencia mecánica a la tracción (42, 43, 44).

Existen estudios realizados en los que se modifican los elementos nanométricos que pudieran influir en la energía superficial y así estimular la adsorción proteica, la migración de células oseas y así su proliferación. Muchas de las modificaciones realizadas sobre las superficies de los implantes se basaban en la modificación química de la superficie (45). Gracias a la rugosidad de las superficies se estimula la diferenciación y formación de osteoblastos como la liberación de TGF β 1 y Prostaglandina PGE2 (46). En diversos estudios se han comprobado el efecto de sustancias biomiméticas y bioactivas como la Hidroxiapatita (47), el fosfato de calcio (48), Fluor (49), factores de crecimiento (50), hormonas de crecimiento (51) sobre las superficies de titanio (52). Otra línea de investigación *in vitro* e *in vivo* se centró en estudiar el comportamiento de superficies hidrófilas en la osteointegración y desarrolló la superficie conocida como superficie SLActive (“chemically modified sand-blasted, large grit and acid-etched”). El objetivo era conseguir una mayor aposición ósea una osteointegración más rápida (53, 54). La superficie SLActive se caracteriza por ser producida bajo unas condiciones atmosféricas y químicas específicas que se basan en humedecer la superficie SLA tras ser aplicado el grabado ácido bajo protección atmosférica en N₂ y luego ser almacenada en solución NaCl isotónica. Esto favorece a que el implante sea un implante químicamente activo con una cantidad mínima de hidrocarburos y carbonos. La superficie SLActive hidratada e hidroxilada mostró tener un ángulo de contacto de avance del agua de 01° indicando su inmediata humectancia y carácter ultrahidrófilo. También se demostró un incremento de la energía libre superficial incrementando el área de contacto agua-superficie (55). Los resultados de porcentajes de contacto hueso implante BIC en un estudio realizado en mini pigs demostraron que la superficie SLActive eran mejores a los 2 y 4 semanas que los de la superficie SLA convencional (53).

Estos resultados juntos con los de los resultados del grupo de investigadores Schwarz y cols. sugieren que el comportamiento de esta superficie merece ser investigada para valorar su influencia en los primeros estadios de osteointegración (56, 57). El medio hidrófilo favorece la interacción entre los diferentes líquidos intersticiales, células y tejido circundante y así acelera el proceso inicial de osteointegración. También se demostró que en las superficies hidrófilas se produce un menor acúmulo de células inflamatorias (58).

e) Procedimiento quirúrgico:

En cuanto al **procedimiento quirúrgico** existen diferencias entre el maxilar y la mandíbula, ya que la mandíbula suele tratarse de un hueso mas duro con mayor cantidad de hueso cortical mientras que el maxilar predomina el hueso esponjoso confiriéndole la característica de hueso blando (59). La mandíbula anterior suele ser muy cortical favoreciendo así la estabilidad primaria de los implantes mientras las zonas posteriores suelen ser más porosas sobre todo en el maxilar, lo que provoca pérdida de estabilidad o dificultad de preparación de los lechos por falta de densidad. Este fenómeno de “hueso blando” ha impulsado a clínicos e investigadores a buscar soluciones para asegurar la estabilidad primaria del implante (60, 61).

También puede influir en la osteointegración la base ósea de la que se parta. Existen situaciones de atrofas severas o defectos que necesitan regeneración y/o reconstrucción de los mismos para proporcionar al implante una buena base ósea que favorezca la osteointegración y no la dificulte (62, 63, 64, 65). Tras la curación completa de las zonas regeneradas, reconstruidas o de hueso nativo de suficiente volumen se procede a la preparación de los lechos implantarios. La técnica de creación de los lechos depende

un poco de cada casa comercial y los protocolos quirúrgicos que recomiendan. En términos generales se realiza un fresado inicial de posicionamiento, un segundo fresado que se realiza con una fresa piloto que ya determina la dirección de inserción, las siguientes de diámetros crecientes a la longitud previamente planificada hasta llegar a la fresa de diámetro correspondiente al implante seleccionado. Esta última fresa siempre será de diámetro algo mas pequeño que el diámetro del implante elegido y así el implante colocado realiza una ligera presión sobre las paredes del lecho y se asegura así de la estabilidad primaria. En huesos muy duros como en la mandíbula anterior esta presión debe minimizarse realizando un paso de rosca antes de la inserción del implante.

f) La estabilidad primaria del implante

La estabilidad primaria del implante se produce por la unión mecánica entre hueso e implante y es necesaria para una correcta curación e osteointegración del implante. Depende de la longitud, diseño del implante, la calidad ósea y la forma del lecho implantario (66, 67).

La falta de estabilidad primaria provoca libertad de movimiento del implante y a consecuencia de ello una posible formación de tejido fibroso entre implante y hueso y fracaso de la osteointegración (68, 69). La estabilidad primaria durante el proceso de osteointegración va dando paso a la estabilidad secundaria (70). Esta se denomina también estabilidad biológica. La combinación entre la estabilidad primaria (estabilidad mecánica) y estabilidad secundaria (estabilidad biológica) se denomina estabilidad general del implante. También se denomina estabilidad biológica del implante (71).

g) Tiempo prudencial de osteointegración:

Como **tiempo de osteointegración** se determinaba un tiempo de espera de 6 meses para el maxilar y 3 meses para la mandíbula (72). Actualmente esta ganando gran importancia (73, 74, 75, 76, 77, 78) la carga inmediata directa o diferida inmediata que estimula parcialmente la remodelación ósea y en condiciones óptimas puede preservar bien los tejidos circundantes. De esta manera la duración total del tratamiento se acorta considerablemente aportando grandes ventajas durante la osteointegración tanto desde el punto de vista funcional como estético (79). La estabilidad primaria para ello es necesaria y se considera un requisito indispensable (80, 81).

Los tiempos recomendados de osteointegración de un implante SLA en el maxilar y en la mandíbula indistintamente es de 8 semanas basándose en los estudios clínicos realizados por Buser y cols. En el último estudio retrospectivo de 2012 siguiendo este protocolo de carga se muestra en 511 implantes una tasa de supervivencia a 10 años del 98,8% y una tasa de éxito del 97,0 %. (82)

La carga propuesta para los implantes SLActive es de 3 semanas basándose en los resultados del estudio de Morton a 2 años en el que los implantes se cargaron a las 3 semanas y la tasa de éxito fue del 97,7% (83).

1.2.4 Diagnóstico de la osteointegración

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes métodos para el diagnóstico de la osteointegración. Se diferencian métodos invasivos y no invasivos.

a) Métodos no invasivos

Los métodos no invasivos son el test de percusión y el radiográfico. En el test de percusión se consideraría osteointegración cuando el tono emitido al percutir sobre la tapa metálica del implante con un mango de un espejo fuera un tono metálico, mientras que si fuera un tono sordo o mate se consideraría no osteointegrado o encapsulado con tejido fibroso (84, 85).

La estabilidad también puede comprobarse mediante la medición electrónica de la amortiguación de los tejidos periimplantarios con el sistema Peiostest® (Siemens, Bensheim, Deutschland) (86, 87).

En el año 1996 Meredith y cols. (88) empezaron a utilizar el método del análisis de la frecuencia resonancia (89, 90, 91, 92, 93, 94). Se describió el Análisis de la Frecuencia de la Resonancia (AFR) como el método que permite estudiar la estabilidad del implante dental en diferentes momentos de la cicatrización ósea, siendo los resultados obtenidos reproducibles intraoperador e interoperador. Este método de estudio está basado en el análisis de la frecuencia, que consta de un transductor en forma de L (1) que va atornillado al implante perpendicular a la cresta ósea (95). Este transductor es estimulado mediante una señal senoide con un frecuencia de 5 a 10 KHz (96, 97, 98), siendo esta señal traducida mediante el análisis de la frecuencia. Los resultados

obtenidos son representados por el cociente de estabilidad del implante ISQ (Implant Stability Quotient) con un intervalo de mediciones que determinan la movilidad del implante de 0 a 100, siendo 100 el de mayor estabilidad y menor movilidad (99, 100, 101).

Posteriormente se desarrolló el Osstell Mentor® que a diferencia del Osstell® el transductor no está unido mediante cable, sino que éste emite una señal electromagnética a un dispositivo atornillado al implante de forma manual que se denomina Smartpeg® (102).

Los métodos radiográficos bi y tridimensionales orientan al visualizar la estabilidad de dimensiones de los tejidos óseos y blandos en el momento de la colocación con respecto a momentos posteriores durante la osteointegración. Una imagen radiolúcida alrededor del implante puede informar de una posible formación de tejido fibroso y fracaso de la osteointegración.

b) Métodos invasivos.

Los métodos invasivos se basan en analizar la morfología estructural histológica (micro y milimétrica) o bien la biomecánica (103, 104, 105).

La histomorfometría trata de cuantificar tejido óseo mediante recuentos y mediciones efectuadas sobre el mismo. Se obtienen diferentes valores, como BIC% (Porcentaje contacto hueso implante) ó BV/TV (Volumen óseo/Volumen tisular). El parámetro BIC corresponde al porcentaje de integración o ratio de contacto óseo, y se define como el hueso en contacto directo con el implante en relación al perímetro total de éste. Se empieza la medida en el hombro de un lado del implante hasta el hombro del lado contrario. Se expresa en forma de porcentaje y se calcula de la siguiente forma:

El valor BIC es igual a la longitud superficie del implante en contacto directo con hueso multiplicado por cien y dividido entre la longitud total del implante.

Histológicamente lo que se valora es el porcentaje de contacto hueso-implante, las áreas de contacto y el contenido. Existen diferentes tipos de tinciones que permiten la cuantificación del tejido óseo (Azul de toluidina, tricrómico de Masson o Levaí Laczó) (106). Mediante inmunohistoquímica se pueden identificar en los cortes presencia de determinadas células o proteínas (107).

Biomecánicamente lo que se mide son los torques de inserción y desinserción descritos por Albrektsson (108). Este método se indica actualmente sólo para estudios de investigación en animales.

También se utiliza el método de torque de inserción que evalúa la fuerza con la que el implante consigue colocarse en el alveolo implantario. Este torque informa de la calidad del hueso y es fundamental para determinar la estabilidad primaria (109, 110).

1.3 Desarrollo de la nueva superficie SLActive: revisión de la bibliografía



Fig. 6 Carga superficial de la superficie SLActive

Las mejoras en los últimos años se han centrado en la microestructura y las características químicas de los implantes. La superficie implantaria es un factor crítico para asegurar la osteointegración. Buser y cols se plantearon que las propiedades más importantes son: Topografía, química, humectancia y cargas de superficie (111).

La superficie SLA se describe como una superficie micro y macrorugosa. Se están haciendo grandes esfuerzos para determinar de forma estandarizada las rugosidades con el fin de que entre los diferentes grupos de investigación se puedan caracterizar la superficie y su topografía con parámetros de descripción de espacios y parámetros híbridos ya consensuados y definidos. De esta manera se evaluará mejor qué topografías favorecen la osteointegración. Las micro-macrorugosidades proveen a las superficies la propiedad de hidrofobia, aunque según describió Massaro y cols. la contaminación con carbonos de las superficies de Titanio expuestas al aire también son responsables de una mayor hidrofobia (112).

La superficie SLActive se trata de una superficie altamente hidroxilada e hidratada que se mantiene sumergida en un medio acuoso que la previene de contaminación. Las superficies micro-macrorugosas se desarrollaron con el fin de aumentar el área geométrico para aumentar las áreas de contacto huso implante. Se ha demostrado que si el implante con la superficie SLActive se retira de su envase acuoso y se seca sigue manteniendo su hidrofilia inicial, ya que los microporos siguen precargados con agua. De esta forma se demuestra la importancia de los gases protectores durante la preparación y el almacenamiento. El incremento de la hidrofilia acelera las reacciones primarias de cicatrización en el tejido colindante inmediato al implante.

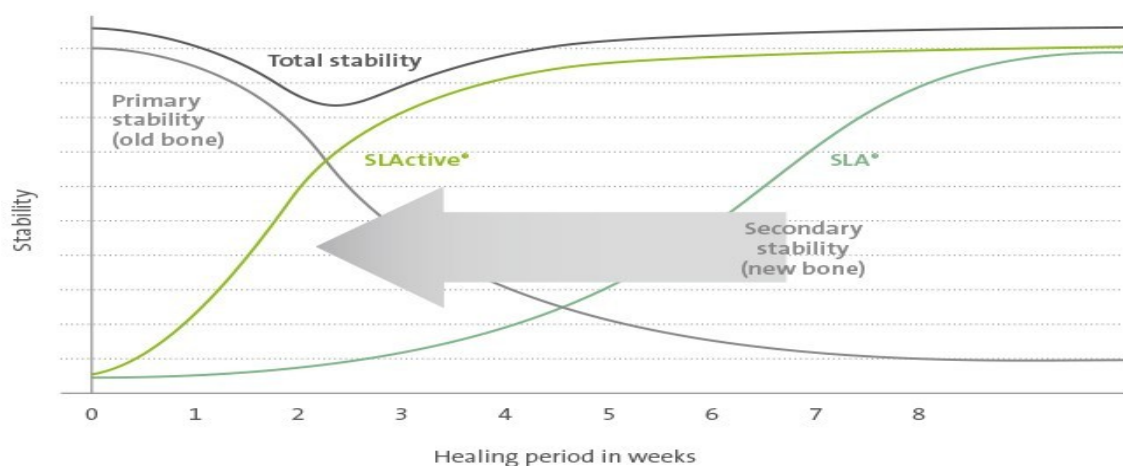


Fig. 7 Desarrollo de la estabilidad en la superficie SLA/ SLActive. Acortamiento notorio del comienzo de la estabilidad biológica o secundaria en el implante SLActive.

Se ha demostrado que el aumento de energía libre superficial de la superficie SLActive estimula a los osteoblastos *in vitro*, incrementando la fosfatasa alcalina y la osteoclastina que contribuye a la neoformación ósea (113).

Las propiedades de superficie son responsables de procesos como la absorción proteica, interacción célula-superficie y desarrollo del tejido celular en la interfase entre el organismo y el biomaterial, factores todos ellos relevantes para la funcionalidad del implante (114).

Se han utilizado variadas técnicas para la producción de superficies rugosas, incluyendo el chorreado de arena, el grabado ácido, combinación de ellas entre otras (115). La superficie SLA tratada mediante chorreado con partículas de corindón y posterior grabado ácido con HCl/H₂SO₄ presenta unos micropocillos de 2-4 µm dentro de las macrorugosidades que pueden observarse a microscopía electrónica. La superficie no es microporosa de manera que disminuye la vulnerabilidad de adhesión bacteriana. Esta superficie rugosa demostró tener una mejoría en la respuesta de aposición de hueso en las valoraciones histomorfométricas. (116, 117) y valores de torque de desinserción más elevados (118). Basándose en estos estudios experimentales comenzaron a cargarse los implantes tras la espera de 6 semanas. Las evaluaciones clínicas durante 3 años demostró resultados favorables con tasas de éxito del 99% (4, 41, 119).

Además de la topografía las características químicas son claves para la aposición de hueso periimplantario. La humectancia de la superficie es dependiente de la energía de superficie e influye el grado de contacto con el medio fisiológico. Un incremento de la

humectancia potencia por tanto el contacto de la superficie del implante con el medio biológico (120). Se asume cierta similitud entre superficies de óxido de titanio limpias hidrófilas con el agua por la hidroxilación/hidrogenación de la capa de óxido y su alta humectancia con agua, lo que conduce a una próxima interacción de la superficie con la capa de agua rodeada de biomoléculas como las proteínas.

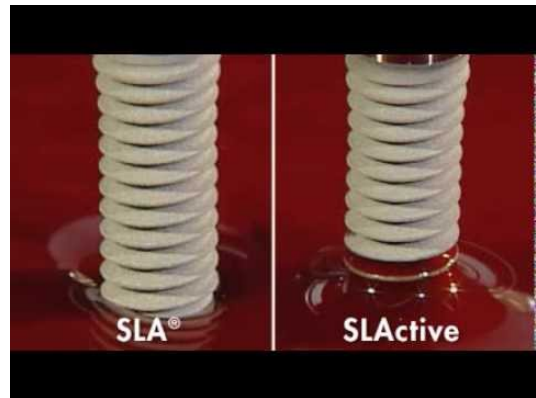


Fig 8. Humectancia de la superficie SLActive

El ángulo de contacto inicial de 0° del agua con la superficie implantaria del SLActive comparado con el ángulo de contacto de 130° de la superficie convencional es lo que caracteriza a la superficie con una mayor humectancia (121).

Los defectos circunferenciales alrededor de implantes en carga temprana se regeneraron antes alrededor de implantes SLActive que en implantes SLA convencionales (122). El torque de desinserción fue mayor en los implantes de superficie SLActive que en los implantes de superficie SLA convencional tras 2 y 4 semanas de osteointegración en el minipig (123). La superficie SLActive también obtuvo mejores resultados de torque de desinserción en la tibia y fémur del conejo comparado con otras 5 superficies diferentes (124). Aparece un incremento de estructuras vasculares entre el día 1 y 14. (125).

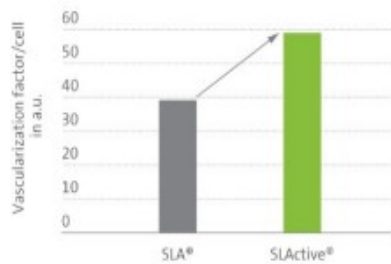


Fig. 9 Vascularización a la semana

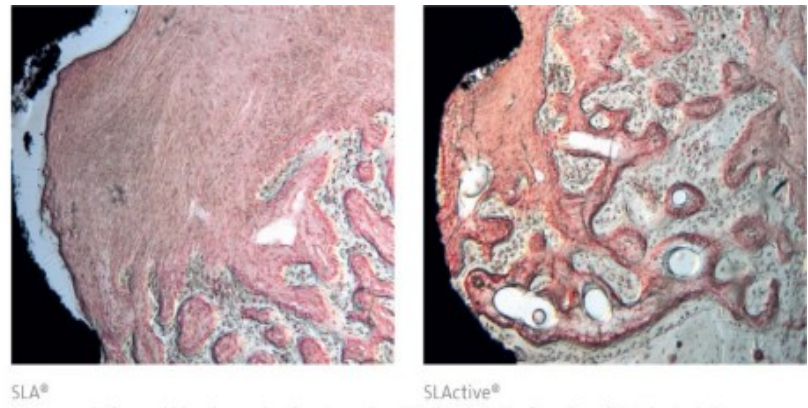


Fig. 10. Formación de tejido vascular a las 2 semanas.

También se observa un incremento de osteocalcina y osteoprotegerina con SLActive® así como un incremento en la producción de factores locales de crecimiento y de vascularización. (158)

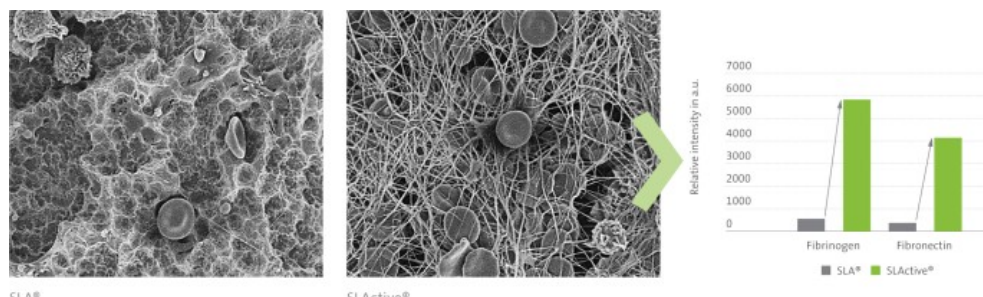


Fig. 11 Formación de fibrinógeno, fibronectina

En estudios histológicos en humanos se demostró que el patrón inicial de integración era superior para la superficie SLActive que para la superficie convencional. Los resultados de los porcentajes de contacto hueso implante (BIC) a las 2 a 4 semanas eran mejores para la superficie SLActive que para la superficie convencional (126). En estadios más tardíos de osteointegración de implantes en minipigs se ve que los resultados histológicos de las dos superficies SLActive y SLA convencional se equiparan (53,127). En humanos se observaron resultados similares (128).

La superficie SLActive también mostró una mejoría en la aposición ósea al estabilizar el

coágulo de sangre gracias a la superficie hidrófila (129, 130, 131). La mejor adhesión del coágulo de sangre a la superficie hidrófila SLActive se considera una propiedad muy ventajosa para los casos con dehiscencias si se compara con la superficie hidrófoba convencional SLA (132, 133).

2. Justificación e Hipótesis

Anteriores estudios han demostrado que el aumento de hidrofilia de las superficies de titanio acortan el tiempo de osteointegración, unión celular y consecuente depósito óseo (53). Por tanto las superficies hidrófilas deberían acortar el tiempo de osteointegración.

En el estudio propuesto se compara así el comportamiento de la superficie SLA hidrófoba con la superficie SLActive hidrófila analizando la estabilidad de los implantes en el momento 0 y en el del sacrificio y el comportamiento histomorfométrico midiendo la cantidad de contacto hueso implante.

3. Material y Método

En el estudio propuesto se operaron un total de 9 conejos neozelandeses que se dividieron en tres grupos según el momento de sacrificio. Un grupo se sacrificó a los 7 días, otro a los 14 días y el tercero a los 28 días. A cada conejo se le colocaron 4 implantes, 2 implantes control de superficie SLA hidrófoba y 2 implantes experimentales SLActive de superficie hidrófila. Los implantes se colocaron en las tibias, 2 implantes en la tibia derecha y 2 implantes en la tibia izquierda.

Las variables que se analizaron fueron la estabilidad inicial y la secundaria en el momento del sacrificio y el contacto hueso implante basado en la histomorfometría tras los distintos momentos de sacrificio 7 días, 14 días y 28 días.

3.1 Consentimiento del comité ético de animales

El protocolo del proyecto fue aceptado por el comité ético de animales de la Universidad Complutense de Madrid en el 2006.

3.2 Selección del tipo de animal



Fig. 12 Conejo neozelandés en el animalario

Para verificar una nueva técnica quirúrgica se considera la experimentación en animales de tamaño medio y grande una buena técnica. El conejo neozelandés ha sido un modelo animal experimental muy utilizado en diferentes campos y mucho en el campo del comportamiento óseo.

El conejo es uno de los modelos animales más utilizados en investigación en odontología. El 35% de los estudios musculoesqueléticos se realizan en el conejo (134). El conejo obtiene su madurez esquelética a los 6-8 meses de vida (135). Esto se demuestra mediante radiografías de la metáfisis .

Las localizaciones más comúnmente estudiadas son la diáfisis femoral y la tibia. La disposición de espacio no es excesiva, aunque suficiente, ya que el estándar

internacional para la evaluación biológica de productos médicos recomienda no más de 6 implantes por espécimen, 3 experimentales y 3 control. Se aconseja también el uso de implantes de unos 2mm de diámetro por 6 mm de longitud para evitar fracturas patológicas (ISO 10993-6), 1994). El hueso tibial y femoral del conejo es muy similar al hueso humano maxilar edéntulo. Es un hueso muy accesible y presenta una muy baja morbilidad para el animal (136).

Para comparar el hueso animal con el tejido óseo humano se debe analizar la microestructura o estructura microscópica. La cortical del hueso humano esta compuesta fundamentalmente por osteones secundarios con una organización muy estricta de mineralización centrífuga (137). Esta organización ósea sólo se encuentra, a parte de en los primates, en los gatos y perros adultos de algunas razas (138).

Existen algunos autores (137, 139) que ponen en duda que el modelo conejo para la experimentación del comportamiento óseo sea válido, ya que su osteogénesis se basa en la formación de osteones primarios y su velocidad de regeneración es más rápida. Sin embargo el comportamiento del tejido óseo durante la osteointegración en el conejo sí aporta mucha información que podrá verificarse en modelos de animales mayores. El modelo del conejo se ha establecido como un modelo animal válido (140, 141, 142, 143). El conejo es un animal de coste reducido que se mantiene sin problemas (144). Los animales se cojen en la edad adulta en la que la estructura ósea es robusta para la colocación de implantes (145) y en la que no existen diferencias entre razas al estar establecido el desarrollo de osteones secundarios (138).

Los conejos seleccionados provenían de la Granja San Bernardo (Navarra) dedicada a la cría de conejos New Zealand destinado a la experimentación animal cumpliendo todos ellos las mismas características: pesar más de 3000 gr., no presentar patologías sistémicas y tener una edad media de 16 semanas.

El cuidado de los animales, la anestesia, el procedimiento quirúrgico y su sacrificio se realizó en el recinto de la facultad de medicina en el animalario de la UCM y siempre en presencia de los veterinarios del mismo.

Según llegaron los conejos de la granja se les mantuvo en el animalario 2 semanas para que se habituasen al medio y poder explorales y hacerles los controles oportunos. Se les examinó para ver si existían patologías sistémicas y parásitos y se les controló de forma continuada la hidratación. La dieta constó de vegetales frescos, heno fresco y agua.

3.3 Selección de Implantes

Según las recomendaciones (ISO 10993-6) 2007) para hacer investigación de implantes dentales en el conejo es recomendable mantenerse dentro de las dimensiones de 2 mm de diámetro por 6 mm de longitud para evitar fracturas en la tibia del conejo, por lo que el implante seleccionado para el estudio fue el implante Straumann Tissue Level Regular Neck Standard Plus 3,3 de diámetro x 8 mm de longitud. Desde el punto de vista morfológico todos los implantes utilizados eran implantes cilíndricos de 3,3 mm de diámetro y 8 mm de longitud (Institut Straumann AG, Peter Merian-Weg 12, 4002 Basel, Suiza) (Fig.1). Se colocaron un total de 36 implantes en 9 conejos. La mitad de los implantes eran de superficie SLA hidrófoba y la otra mitad presentaban la superficie SLActive hidrófila. En cada tibia, un total de 18 tibias se colocaron dos implantes SLA de superficie hidrófoba en una y otras dos de superficie hidrófila SLActive en la otra.

3.4 Anestesia y procedimiento quirúrgico:

Previo a la anestesia los conejos no estuvieron en ayuno, ya que en el conejo no se han descrito vómitos ni aspiraciones. Se les proveyó de agua hasta 60 minutos antes de la anestesia. Los conejos fueron premedicados con atropina 0,05 mg/Kg. La anestesia de los animales se realizó con Ketamina/Xilacina 35/5 mg/kg IM. Se utilizaron también anestésicos locales en la zona a intervenir.



Fig. 13 Infiltración de los anestésicos en la vena marginal auricular

La cirugía se desarrollo en 2 fases:

Rasurado, limpieza y desinfección de la superficie a interevnir. Aislamiento con paños quirúrgicos.

1ª fase: incisión mucocutánea con una hoja del 22 a espesor total de unos 50 mm de longitud desde la meseta tibial recorriendo la tibia en sentido caudal en la tibia derecha. Elevación del colgajo mucoperióstico. Colocación de 2 implantes de superficie SLActive hidrófila en dicha tibia.

El fresado se realizó a 800 rpm y la inserción de los implantes a 35 Ncm.

La herida se sutura con 5 puntos simples con seda trenzada de 3/0.

2ª fase: incisión mucocutánea a espesor total de unos 50 mm de longitud desde la meseta tibial recorriendo la tibia en sentido caudal en la tibia izquierda. Colocación de 2 implantes de superficie SLA hidrófoba en dicha tibia.

El fresado se realizó a 800 rpm y la inserción de los implantes a 35 Ncm.

La herida se sutura con 5 puntos simples con seda trenzada de 3/0.

Todos los implantes quedaron estables, la superficie rugosa quedó infraósea y no se presentaron en ningún caso incidencias intraoperatorias.

Como analgesia postoperatoria se aplicó buprenorfina (BUPRE) SC 0,05 mg/kg y el antibiótico terramicina en polvo soluble en agua de bebida durante 8 días. La dieta que siguieron fue dieta de mantenimiento para conejos de SAFE.



Fig. 14 Implantes colocados en la tibia antes de proceder a la sutura

3.5 Sacrificio de los animales

En el día 7, 14 y 28 se procedió al sacrificio correspondiente de los animales. La eutanasia se realizó mediante la sobredosis de barbitúricos Pentobarbital IV en la vena marginal de la oreja. Después se procedió a la disección de la tibia y el corte de las muestras tibiales fijadas mediante un sistema de sujeción y con discos de sierra. Las

muestras fueron almacenadas en tubos de metacrilato y fijadas con formol durante los siguientes 7 días.

Secuencia

Momento	Histología	Estabilidad del implante	N. animals	N. implantes
Día 0		18 SLA 18SLAa	9	36
Día 7	3 conejos sacrificados 12 SLA 12 SLAa	12 SLA 12 SLAa	3	12
Día 14	3 conejos sacrificados 12 SLA 12 SLAa	12 SLA 12 SLAa	3	12
Día 28	3 conejos sacrificados 12 SLA 12 SLAa	12 SLA 12 SLAa	3	12

Fig. 15 Tabla de secuencia, momentos de sacrificio y obtención de datos en los diferentes momentos

3.6 Análisis de la estabilidad

La estabilidad de los implantes se midió mediante el sistema resonador de frecuencias (Ostell®Mentor), sistema desarrollado por el grupo de Meredith y cols. (88), validado por diferentes autores obteniendo el valor ISQ (89-100). La estabilidad del implante se midió al inicio, en el momento 0, para analizar los valores de estabilidad primaria y en un segundo momento correspondiente al del sacrificio para analizar la estabilidad secundaria. Los momentos de sacrificio fueron el día 7, día 14 y día 28.



Fig. 16 Medición de la estabilidad mediante el sistema Ostell Mentor®

3.7 Procesado de las muestras y análisis histomorfométrico

Las muestras tibiales se enviaron al laboratorio de histología de la facultad de Veterinaria de la Universidad de Lugo donde realizaron el procesado de las muestras y su análisis histomorfométrico (146).

Tras el sacrificio de los animales se procedió a la toma de las muestras de los implantes y su tejido óseo circundante para su posterior estudio histomorfométrico. Una vez extraídas, todas las muestras fueron introducidas en botes con formol al 10% durante un periodo de 24h. Posteriormente se procesó siguiendo un protocolo muy minucioso.

1) Corte de la muestra:

De cada pieza ósea se obtuvo un bloque de 1 cm de grosor que fue estandarizado para cada muestra de cada implante en su correspondiente tibia. Para realizar este paso se utilizó una sierra de banda con refrigeración de agua.



Fig. 17 Sierra de banda (Exakt 400, System, Aparatebau GMBH)

2) Deshidratación:

La deshidratación de las muestras supuso el paso previo a la inclusión de las muestras en bloques de metacrilato. Para permitir la entrada del metacrilato en el tejido óseo es fundamental extraer el agua antes. Se procedió a la deshidratación de las muestras bajo agitación constante en concentraciones crecientes de etanol (80 % alcohol durante tres días, 96 % alcohol durante tres días, 100 % alcohol durante tres días, 100 % alcohol durante tres días).



Fig. 18 Agitador de vaivén que acoge recipientes con diferentes concentraciones de alcoholes. Las muestras permanecen 3 días en en cada concentración de alcohol.

3) Infiltrado

Durante este paso se procedió a sustituir el alcohol por una concentración creciente de metacrilato. La infiltración plástica se efectuó mezclando glicolmetacrilato (Technovit

7200[®], VLC - Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) con alcohol etílico a distintas concentraciones, finalizando con dos infiltraciones con glicolmetacrilato puro. Todos los pasos se realizan bajo agitación constante con la misma máquina utilizada en el paso anterior. El protocolo de infiltración que se siguió fue con concentraciones de alcohol decrecientes y concentraciones crecientes de metacrilato hasta el noveno día. En el día 9 hasta el 18 se elimina el alcohol y el infiltrado se realiza al 100% con Technovit 7200[®].

4) Inclusión y polimerización

Para llevar a cabo la inclusión se introdujeron las muestras de tejido en unos moldes de polietileno que se llenaron de glicolmetacrilato (Technovit 7200[®]) bajo efecto de vacío, para eliminar las posibles burbujas existentes en el tejido y someterlas a polimerización por luz. La fotopolimerización tuvo lugar en dos pasos. En un primer paso se aplicó luz de baja intensidad a menos de 40°C durante 4 horas y en un 2º paso luz ultravioleta a gran intensidad durante 12 horas. Por último los bloques permanecieron en una estufa a 37 °C durante 24 horas y se procedió a la retirada del molde.

5) Preparación del bloque para obtener una superficie paralela

Los bloques se fijaron a la sierra de banda para realizar el corte seleccionado en cada tipo de muestra. Se procedió a realizar una radiografía de cada espécimen para ver con claridad el interior de cada muestra y saber por dónde realizar el corte por la mitad de cada implante en sentido vestibulo-lingual. En la radiografía se apreciaba con mayor radiopacidad la figura de cada implante, seguido de la silueta del tejido óseo (más radiolúcida que el implante) pudiendo delimitar también la forma del bloque de metacrilato como la parte más radiolúcida. Este paso sirvió para superponer cada bloque a su radiografía correspondiente y trazar en el mismo una línea con rotulador por el eje

longitudinal de cada implante. La línea fue la referencia utilizada para realizar el corte de la muestra.



Fig. 19 Bloque fijado a la sierra de banda y listo para ser seccionado

Los semibloques designados para analizar se montaron en una primera lámina acrílica provisional (porta) que se adhirió con una resina (Technovit 4000® - Heraus Kulzer GMBH) y permite utilizar la muestra en la siguiente fase de preparación.

6) Preparación de la superficie de interés

La superficie de interés mostraba irregularidades y poros, por lo que el siguiente paso consistió en el pulido de la muestra con una máquina de pulido (Exakt-Micro Griding System®, Aparatbau GMBH) la que pule mediante paños de pulido abrasivos de distintos granos. La superficie se sometió a un micropulido con lijas de carburo de silicio de grosor de grano 800, 1200, 2400 y 4000, empleando refrigeración por agua hasta que la superficie estuvo preparada.



Fig. 20 Máquina de pulido con refrigeración de agua. En la base tiene un disco al que se le acoplan las lijas de distinto grano. En el centro existe un espacio donde el porta provisional queda fijado, dejando la superficie de la muestra de cara a las lijas.

Una vez pulida la superficie de interés, para eliminar los orificios correspondientes a burbujas de aire que pudieran existir en la superficie, se realizó una reinfiltración. Para ello se sumergió la superficie de la muestra en glicolmetacrilato (Technovit 7200®) y se colocó en una máquina de vacío para extraer las posibles burbujas retenidas en el interior de la muestra sustituyéndolas por resina. Una vez que las burbujas hubieron desaparecido, manteniendo el efecto de vacío, se procedieron a polimerizar de nuevo con luz azul durante 3 horas y a continuación se mantuvieron 24 horas en estufa para que la resina terminase de endurecerse. Tras volver a preparar la superficie de la muestra en la máquina de pulido (repitiendo el paso anterior), la superficie de la muestra se adhirió a un segundo porta (definitivo) con resina fotopolimerizable (Technovit 7210® - Heraeus Kulzer GMBH) mediante el empleo de una prensa de fotopegado (Exakt 402). La fotopolimerización se activó con luz ultravioleta. Una vez fijada la muestra al portaobjetos definitivo, mediante una sierra de banda conectada a un micrómetro, se procedió a realizar un corte en el bloque a unas 200-300 micras de distancia del porta definitivo, obteniéndose como resultado un portaobjetos con una

muestra de aproximadamente 250 micras. A la muestra obtenida tras el corte se aplicaron paños de pulido de distintos grosores para rebajar su grosor hasta aproximadamente 60µm.

7) Tinciones

Las muestras con la superficie pulida y tratada fueron sometidas a un proceso de tinción con el método de Levai Laczcó para su posterior análisis en el microscopio (168).

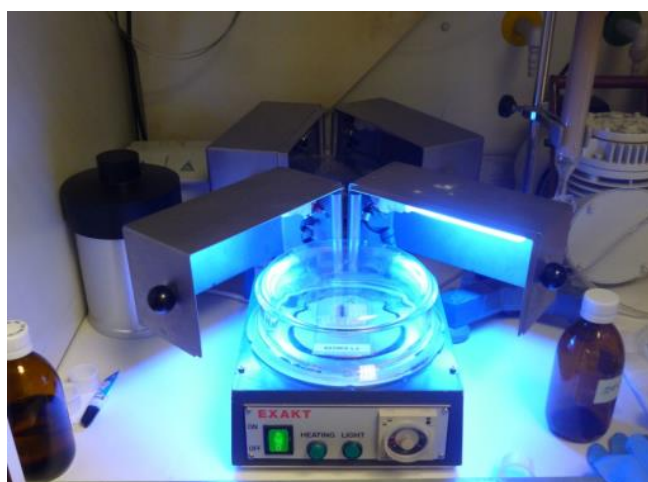


Fig. 21 Máquina de vacío con luz azul (Exakt 530, System, Aparatebau GMBH).

El procedimiento de tinción de Lévai Laczcó se basa en realizar en un primer paso la inmersión de la muestra en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% durante 5 minutos con movimiento constante, después lavarlo con agua destilada dos veces, sumergirlo en ácido acético (CH_3COOH) al 5% durante 1 minuto. Volver a lavarlo con agua destilada dos veces. Después sumergirlo en la solución A durante 20 minutos (Azur II al 1% en agua destilada. Azul de metileno al 1% en agua destilada. Na_2CO_3 al 1% en agua destilada. Una parte de Azur II con una parte de azul de metileno y dos partes de Na_2CO_3 (1%). Se vuelve a lavar con agua destilada dos veces. Ahora otra inmersión en la solución B durante 5 segundos (Pararosnilina al 1% en agua destilada). Los cortes se

deben sumergir individualmente en esta tinción. Finalmente se vuelve a lavar con agua destilada y secado.

8) Descripción de la técnica histométrica.

Las preparaciones se fotografiaron utilizando una cámara digital a 40 aumentos empleando un microscopio óptico motorizado (BX51, Olympus, Japón). Dichas fotografías son combinadas por un programa informático (Cell Sens Dimensions, Olympus, Japón) para obtener imágenes de alta resolución de toda la muestra en su conjunto y con el que se efectuaron las mediciones ayudados de una tableta digitalizadora (Intuos 4 large, Wacom, Saitama, Japón).

9) Medición del BIC (Bone to Implant Contact Rate A-D)

El contacto hueso implante (BIC Bone to Implant Contact Rate A-D) se definió como la longitud de hueso en contacto directo con la superficie del implante en relación al perímetro total del implante empezando desde el hombro del implante hasta la rosca más apical.

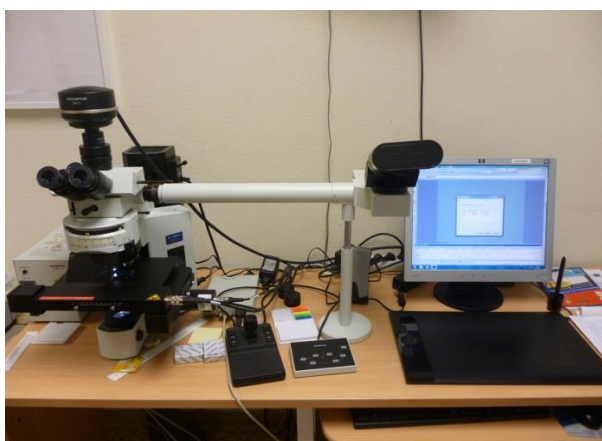


Fig. 22 Microscopio óptico acoplado a un sistema informático.

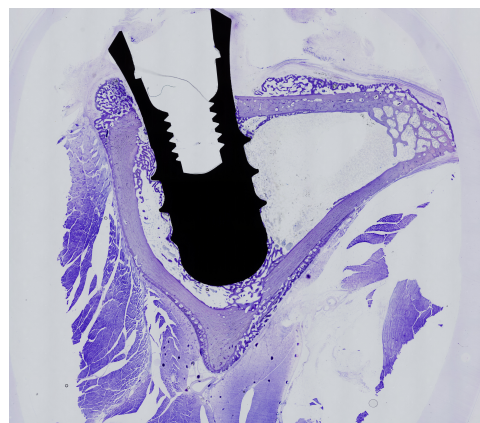


Fig. 23 Corte histológico SLActive 14 días

3.8 Análisis estadístico

La hipótesis de normalidad de la distribución de datos fue analizada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, aceptando la hipótesis nula de Normalidad en la distribución de muestra variable. Los datos entre los diferentes grupos se compararon usando el análisis paramétrico de la t de student para diferencias de medias de muestras independientes bajo la suposición de Normalidad, y asumiendo varianzas iguales, repitiendo dichos análisis histomorfométricos a los 7, 14 y 28 días. Se consideró siempre significativo un valor de $p < 0,05$. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS v. 15.0 para Windows (SPSS, Chicago, ILL, USA).

4. Resultados

a) Tabla de datos obtenidos

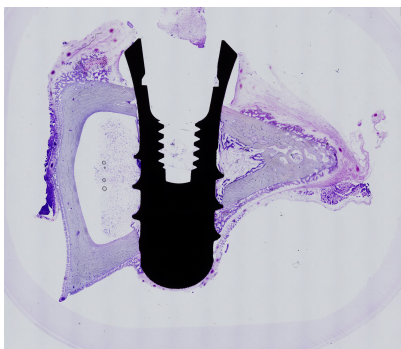
Conejo	Implante	BIC 1	ISQ 0	ISQ1	Sup*	Tpo-Sacr**
1	1	25,92	69	83,00	0	2
1	2	35,77	83	86,00	0	2
1	3	35,36	77	85,00	1	2
1	4	40,62	75	87,00	1	2
2	5	20,41	32	78,00	0	3
2	6	31,12	30	82,00	0	3
2	7	40,86	70	80,00	1	3
2	8	43,74	71	85,00	1	3
4	13	22,74	78	84,00	0	3
4	14	35,67	73	80,00	0	3
4	15	32,7	68	84,00	1	3
4	16	38,35	51	86,00	1	3
6	21	39,19	42	62,00	0	1
6	22	26	42	54,00	0	1
6	23	40,64	68	72,00	1	1
6	24	31,67	72	78,00	1	1
7	25	15,68	58	62,00	0	1
7	26	18,77	80	62,00	0	1
7	27	16,67	49	70,00	1	1
7	28	23,07	75	70,00	1	1
8	29	26	62	80,00	0	2
8	30	31,67	73	78,00	0	2
8	31	39,19	65	81,00	1	2
8	32	40,64	76	86,00	1	2
9	33	41,34	55	77,00	0	3
9	34	43,87	69	78,00	0	3
9	35	47,13	74	81,00	1	3
9	36	46,48	70	79,00	1	3

Fig. 24 Tabla de resultados

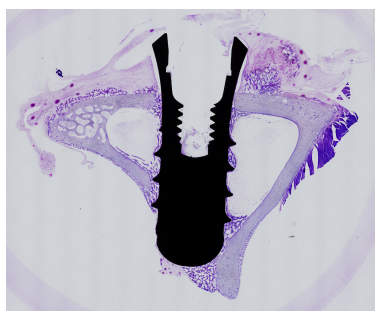
* Superficie : 0=SLA /Control 1=SLAa /Experimental

** Momento de sacrificio: 1=7 días; 2= 14 días y 3=28 días

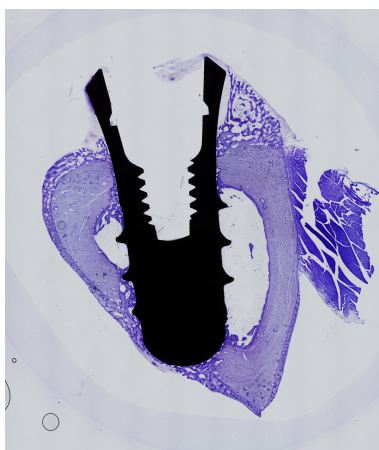
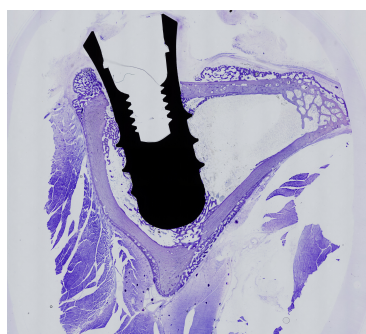
b) Imágenes histológicas de los Implantes SLA y SLActive a los 7, 14, 28 días



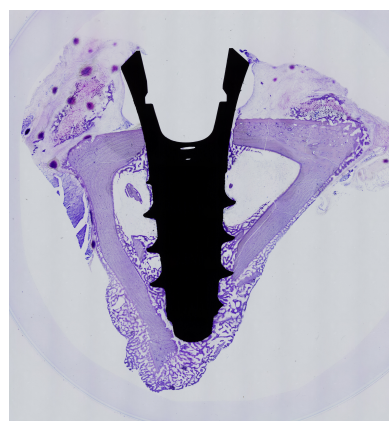
SLActive 7

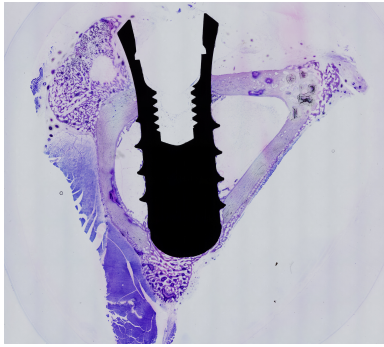


SLActive 14

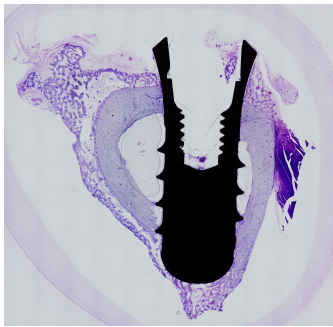
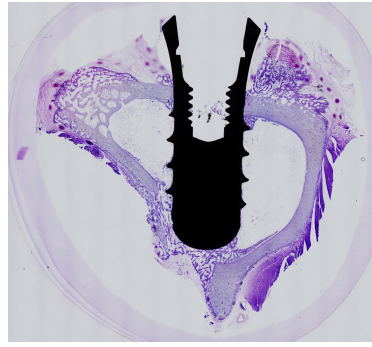


SLActive 28

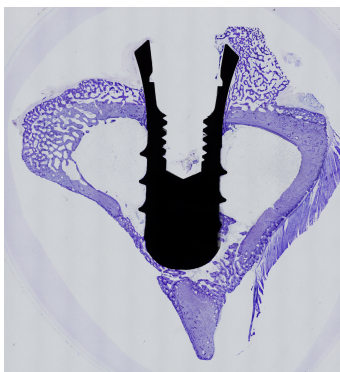
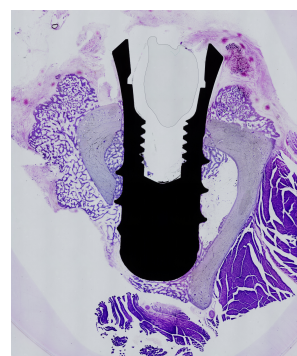




SLA7



SLA 14



SLA 28

4.1.- Descripción de la muestra

Se operaron 9 conejos neozelandeses que se enumeraron (C1-C9). A cada conejo se le colocaron 2 implantes SLActive en la tibia de la pata derecha y 2 implantes SLA en la tibia de la pata izquierda. El conejo C3 se murió el día de la intervención por intolerancia a los anestésicos y el conejo C5 presentó una sepsis generalizada a los 3 días de la intervención.

4.2.- Análisis global de los resultados.

Se colocaron un total de 36 implantes ITI, 18 de superficie convencional SLA (hidrófoba) y 18 con superficie SLActive (hidrófila). Dos conejos se murieron, de manera que se perdieron 4 implantes del día 7 y del día 14.

Los resultados por lo tanto se basan en 14 implantes SLA y 14 implantes SLActive.

Tras realizar el contraste de la t de student para diferencias de medias de muestras independientes bajo la suposición de Normalidad, y asumiendo varianzas iguales, obtuvimos que nuestro pvalor (Asymp. Sig. (2-tailed))=0.033 es menor que un alfa del 0.05 o nivel de significación, por lo que no podemos aceptar que las medias en ambos grupos sean iguales, siendo en el caso del grupo experimental superiores a un nivel de significación del 5%.

De forma global la media de contacto hueso implante (BIC) para los implantes SLA fue de 29, 58%. (SD. 8,76); frente a la media del grupo SLActive que fue de 36,94 (SD 8,58). La diferencia entre ambos grupos fue **estadísticamente significativa**. [Media: -7,35; p=0,033; IC 95% (-14,09; -0,62).]

La media del valor ISQ basal (valor del resonador de frecuencia Ostell para determinar la estabilidad) en el momento 0 para los implantes SLA fue de 63,57 (SD 19,12) frente a SLActive que fue de 65,43 (SD 13,41), siendo así un resultado que no presenta diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

La media del valor ISQ final tras el sacrificio se valora por grupos de tiempos de sacrificio en los siguientes apartados.

4.3.- Análisis de los resultados histomorfométricos (BIC-Porcentaje de contacto hueso-implante)

Mto/Sacrificio	Superficie	n	BIC%	DS
7	SLA	4	24,91	10,46
	SLAa	4	28,01	10,42
14	SLA	4	29,84	4,78
	SLAa	4	38,95	2,49
28	SLA	6	32,53	9,59
	SLAa	6	41,54	5,46

Fig. 25 Valores BIC% en los diferentes momentos de osteointegración.

Se sacrifican 2 conejos a los 7 días, 2 a los 14 días y 3 a los 28 días. Por tanto las muestras se analizan por grupos de tiempos de sacrificio:

4.3.1.- Análisis histomorfométrico 7 días

A los 7 días de osteointegración se sacrificaron 2 conejos. Se obtuvieron 4 muestras de implantes SLActive y 4 muestras de implantes SLA.

La media de porcentaje BIC para la superficie SLActive fue de 28,02% (SD 10,42) frente a la media de SLA que fue de 24,91 (SD 10,46).

Si comparamos los resultados entre una superficie y otra se obtiene un resultado de cambio de BIC estadísticamente no significativo.

[Media: -3,10; p=0,69; IC 95% (-21,16; 14,96)].

Mean	Std. Deviation				
24,9100	10,45624				
28,0125	10,42292				
0,689	-3,10250	7,38191	-21,16538	14,96038	

Fig. 26 Resultados estadísticos de BIC% 7 días

4.3.2-. Análisis histomorfométrico 14 días

A los 14 días de osteointegración se sacrificaron 2 conejos. Se obtuvieron 4 muestras de implantes mod SLA y 4 muestras de implantes SLA.

La media de porcentaje BIC para la superficie SLActive fue de 38,95% (SD 2,49) frente a la media de SLA que fue de 29,84% (SD 4,78).

Si comparamos los resultados entre una superficie y otra se obtiene un resultado de cambio de BIC estadísticamente **significativo con un valor p= 0,015**.

[Media: -9,11; p=0,155; IC 95% (-15,71; -2,52)].

29,8400	4,78281				
38,9525	2,48936				
0,015	-9,11250	2,69593	-15,70920	-2,51580	

Fig. 27 Resultados estadísticos de BIC% 14 días

4.3.3-. Análisis histomorfométrico 28 días

A los 28 días de osteointegración se sacrificaron 3 conejos. Se obtuvieron 6 muestras de implantes mod SLA y 6 muestras de implantes SLA.

La media del porcentaje BIC para la superficie SLActive a los 28 días de osteointegración fue de 41,54% (SD 5,46) frente a la media de SLA que fue de 32,53 (SD 9,6). Este resultado no muestra una diferencia estadísticamente significativa, aunque sí una tendencia a favor de la superficie SLActive.

[Media: -9,02; $p=0,073$; IC 95% (-19,07; 1,03)],

32,5250	9,59998
41,5433	5,46399
0,073	-9,01833
	4,50952
	-19,06617
	1,02951

Fig. 28 Resultados estadísticos de BIC% 28 días

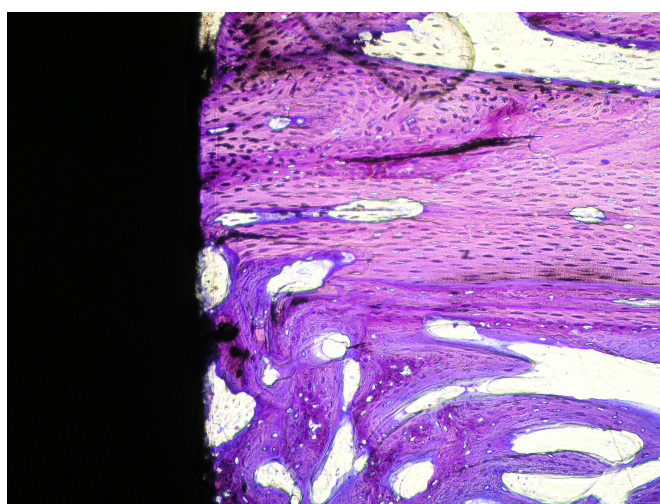


Fig. 29 Corte histológico de un implante de superficie SLActive a los 28 días

4.4.- Análisis de los resultados de Estabilidad (ISQ)

Mto/Sacrificio	Superficie	n	ISQ inicial	DS	ISQ final	DS
7	SLA	4	55,5	17,99	60	4
	SLAa	4	66	11,69	72,5	1,89
14	SLA	4	71,75	8,77	81,75	3,50
	SLAa	4	73,25	5,56	84,75	1,32
28	SLA	6	56,17	20,95	79,83	2,71
	SLAa	6	67,33	8,24	82,50	2,88

Fig. 30 Valores ISQ en los diferentes momentos de osteointegración

Mediante el sistema del resonador de frecuencias (Ostell®) se obtuvo una medida ISQ que permitió contabilizar la estabilidad del implante. Se analizó la estabilidad del implante en el momento 0, momento inmediato después de su inserción que determinó la estabilidad primaria. Esta medición se realizó en todos los implantes colocados (36 Unidades), aunque solo se analizaron 28 por la pérdida de los dos conejos que hubo posteriormente.

4.4.1-. Análisis global del ISQ

El valor medio de estabilidad primaria de todos los 28 implantes fue de 64,5.

El valor medio de estabilidad primaria para los 14 SLActive fue de 65,43 y para los 14 SLA de 63,57.

La media del valor ISQ basal (valor del resonador de frecuencia Ostell para determinar la estabilidad) en el momento 0 para los implantes SLA fue de 63,57 (SD 19,12) frente

a SLActive que fue de 65,43 (SD 13,41), siendo así un resultado que no presenta diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

4.4.2.- Análisis ISQ 7 días

Los resultados de estabilidad primaria a los 7 días de los implantes con superficie SLActive fue de 66 de media y el resultado de la superficie SLA de 55,50 siendo un resultado estadísticamente no significativo. [Media: -10,5; p=0,365; IC 95% (-36,75; 15,75)].

Los resultados de la estabilidad secundaria a los 7 días de sacrificio de los implantes con superficie SLActive fue de 72,50 de media y el resultado de la superficie SLA de 60 siendo un resultado estadísticamente significativo. [Media: -12,5; p=0,004; IC 95% (-19,24; -5,76)].

55,50	17,991			
66,00	11,690			
60,00	4,000			
72,50	3,786			
0,365	-10,500	-36,750	15,750	
0,371	-10,500	-37,836	16,836	
0,004	-12,500	-19,238	-5,762	
0,004	-12,500	-19,243	-5,757	

Fig. 31 Resultados estadísticos de ISQ 7 días

4.4.3.- Análisis ISQ 14 días

Los resultados de estabilidad primaria a los 14 días de los implantes con superficie SLActive fue de 73,25 de media y el resultado de la superficie SLA de 71,75 siendo un

resultado estadísticamente no significativo. [Media: -1,5; p=0,78; IC 95% (-14,20; -11,21)].

Los resultados de la estabilidad secundaria a los 14 días de sacrificio de los implantes con superficie SLActive fue de 84,75 de media y el resultado de la superficie SLA de 81,75 siendo un resultado estadísticamente no significativo. [Media: -3; p=0,22; IC 95% (-8,36; 2,36)].

71,75	8,770			
73,25	5,560			
81,75	3,500			
84,75	2,630			
0,782	-1,500	-14,205	11,205	
0,784	-1,500	-14,787	11,787	
0,220	-3,000	-8,356	2,356	
0,223	-3,000	-8,458	2,458	

Fig. 32 Resultados estadísticos de ISQ 14 días

4.4.4.- Análisis ISQ 28 días

Los resultados de estabilidad primaria de los implantes con superficie SLActive fue de 67,33 de media y el resultado de la superficie SLA de 56,17 siendo un resultado estadísticamente no significativo. [Media: -11,17; p=0,27; IC 95% (-31,64; 9,31)].

Los resultados de la estabilidad secundaria a los 28 días de sacrificio de los implantes con superficie SLActive fue de 82,5 (SD 2,88) de media y el resultado de la superficie SLA de 79,83 (SD 2,71) siendo un resultado estadísticamente no significativo. [Media: -2,67; p=0,13; IC 95% (-6,27; 0,93)].

56,17	20,952				
67,33	8,238				
79,83	2,714				
82,50	2,881				
0,252	-11,167	9,191	-31,645	9,312	
0,267	-11,167	9,191	-33,236	10,902	
0,130	-2,667	1,616	-6,267	0,934	
0,130	-2,667	1,616	-6,269	0,936	

Fig. 33 Resultados estadísticos de ISQ 28 días

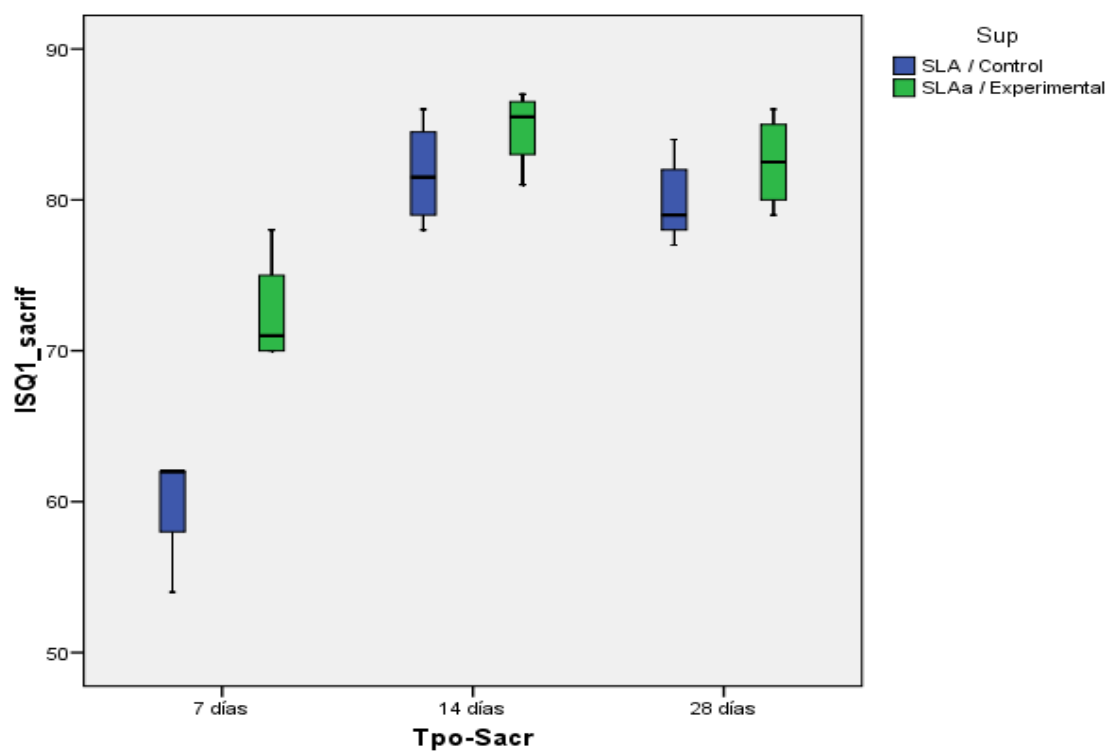


Fig. 34 Resultados ISQ en los diferentes días con las dos superficies.

4.4.5.- Análisis del incremento del ISQ

El resultado del análisis del incremento del valor de estabilidad en el tiempo comparando los valores iniciales ISQ (momento 0) con los valores finales de ISQ en los diferentes tiempos de osteointegración muestran un claro incremento en las dos superficies.

Estos incrementos y descensos entre el día 7, 14 y 28 días no pueden compararse, ya que se trata de sujetos diferentes. En todos los casos los valores de estabilidad primaria fueron menores que los de estabilidad secundaria. Este incremento es intrasujeto.

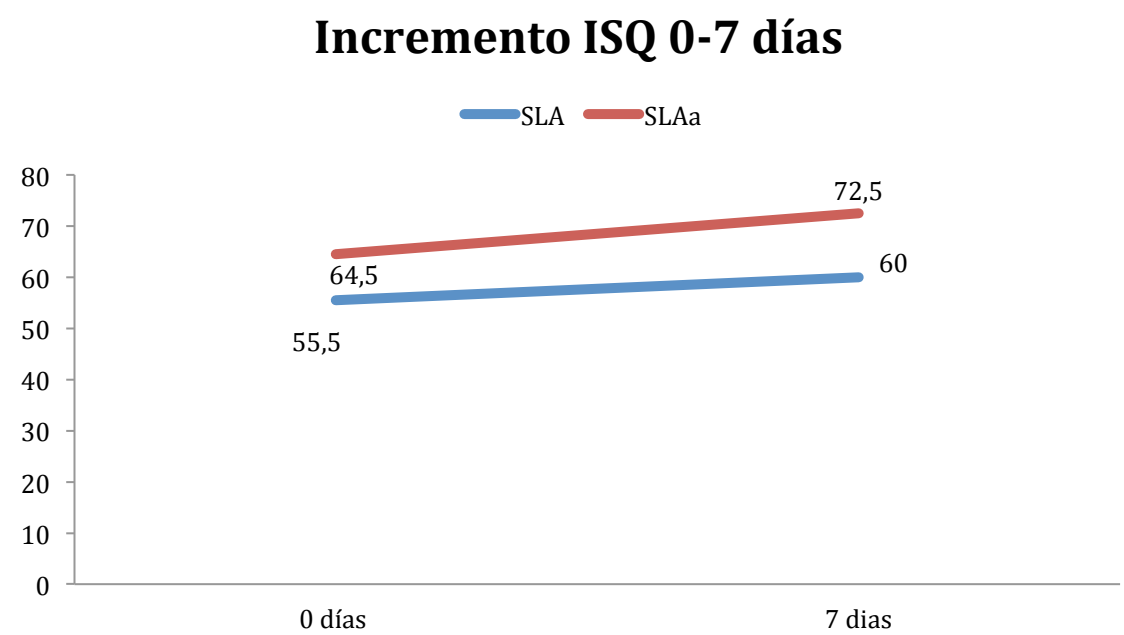


Fig. 35 Incremento ISQ del día 0 al 7.

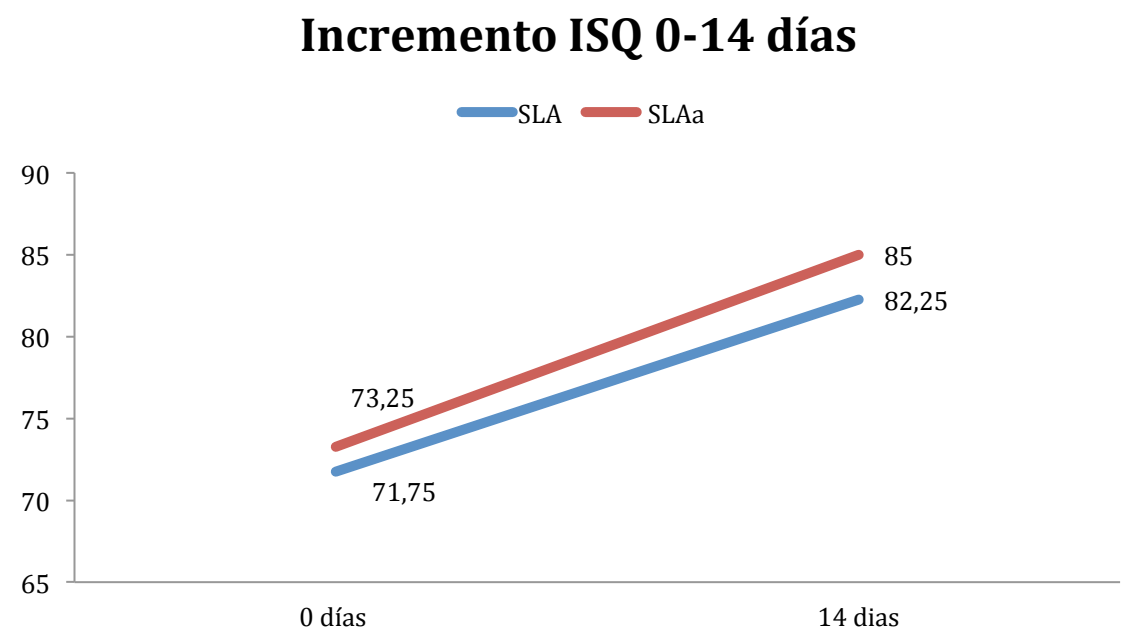


Fig. 36 Incremento ISQ del día 0 al 14.

Incremento ISQ 0-28 días

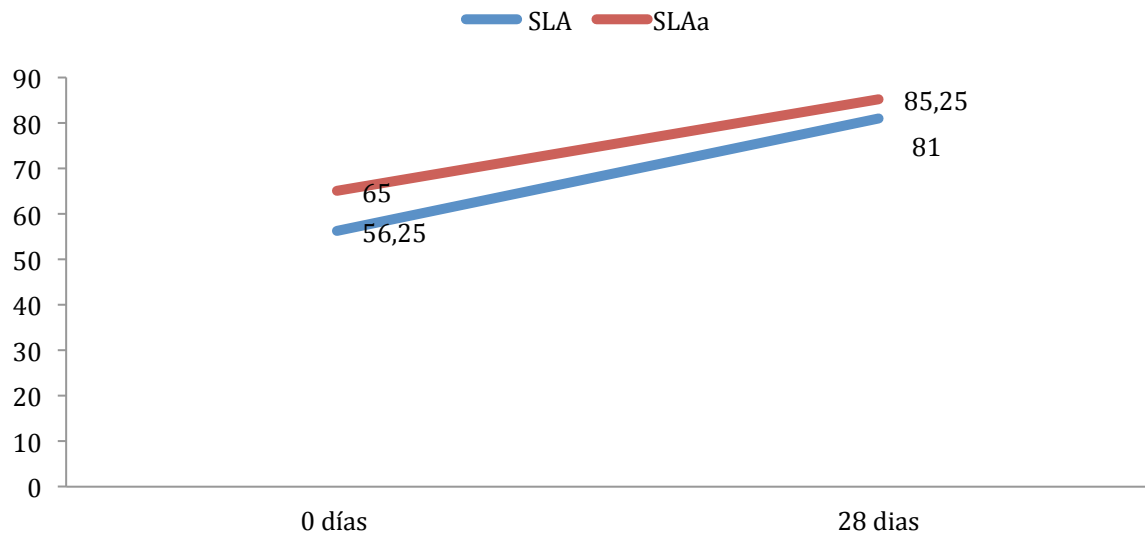


Fig. 37 Incremento ISQ del día 0 al 28.

5. Discusión

5.1 Diseño y metodología del estudio

5.1.1 Animal de experimentación

La investigación animal unida a la investigación en el humano aporta grandes avances en la medicina y su desarrollo y provee de conocimiento sobre procesos fisiológicos y patológicos en el humano. (147). El uso de animales de experimentación debe basarse en principios científicos, éticos y legales. Si el investigador se mantiene dentro de estas premisas tendrá éxito en sus actividades científicas y en el valor de sus trabajos de investigación (148).

Los estudios en animales son necesarios para la investigación del comportamiento óseo. Es necesario realizar una correcta selección del animal para que los datos sean extrapolables al humano. Por ello hay que considerar determinados criterios, como el coste económico que no debe de ser excesivo, las reacciones operatorias y postoperatorias lo más parecidas posibles al del ser humano utilizando el mismo tipo de instrumental e implantes. El conejo neozelandés es un modelo ya establecido para la investigación del comportamiento óseo tanto en odontología como en traumatología. El conejo es uno de los modelos animales más utilizados en investigación en odontología. El 35% de los estudios musculoesqueléticos se realizan en el conejo (134). A pesar de que el ciclo de osteogénesis en el conejo se reduzca a 6 semanas, frente a los 12-18 semanas del humano, no se comporta de una forma excesivamente distinta de manera que se trata de un modelo muy válido para la investigación (138). Brunski en 1999 describe que la osteogénesis en el conejo se produce en 6 semanas si la colocación del implante no presenta dehiscencias o defectos (140).

Las localizaciones más comúnmente estudiadas son la diáfisis femoral y la tibia. La disposición de espacio no es excesiva, aunque suficiente, ya que el estándar internacional para la evaluación biológica de productos médicos recomienda no más de 6 implantes por espécimen, 3 experimentales y 3 control. Se aconseja también el uso de implantes de unos 2mm de diámetro por 6 mm de longitud para evitar fracturas patológicas (ISO 10993-6), 2007). El hueso tibial y femoral del conejo es muy similar al hueso humano maxilar edéntulo. Es un hueso muy accesible y presenta una muy baja morbilidad para el animal (136).

Para comparar el hueso animal con el tejido óseo humano se debe analizar la microestructura o estructura microscópica. La cortical del hueso humano esta compuesta fundamentalmente por osteones secundarios con una organización muy estricta de mineralización centrífuga (137). Esta organización ósea sólo se encuentra, a parte de en los primates, en los gatos y perros adultos de algunas razas (138).

Aunque existen algunos autores (137, 139) que ponen en duda de que el modelo conejo para la experimentación del comportamiento óseo otros muchos lo utilizan para analizar comportamientos musculoesqueléticos de los tejidos (140, 141, 142, 143). El conejo es un animal de coste reducido con un mantenimiento sencillo (144). Los animales se cojen en la edad adulta en la que la estructura ósea es robusta para la colocación de implantes (147) y en la que no existen diferencias entre razas al estar establecido el desarrollo de osteones secundarios (138).

Para el estudio de la osteointegración de los implantes el modelo de conejo es válido y aporta grandes ventajas como el bajo coste económico, la posibilidad de colocar un número considerable de implantes (2 por tibia y 2 por fémur) de manera que la cantidad de sacrificios de animales no es alto. Nuestro estudio valoró una cantidad de 36 implantes en 9 conejos.

5.1.2 Selección de los Implantes

En este estudio los implantes utilizados fueron implantes de la casa Straumann (Institut Straumann AG, Peter Merian-Weg 12, 4002 Basel, CH). Se utilizaron 2 tipos. Para el grupo control se utilizó el implante Straumann de superficie SLA y para el grupo experimental SLActive. Las dimensiones del implante de nuestro estudio fueron de 3,3 mm de diámetro y 8 mm de longitud ajustado a las dimensiones propuestas por las recomendaciones ISO (ISO 10993-6) 1994). El implante es un implante cilíndrico de Titanio grado IV comercializado para el uso en humanos sin ningún tipo de modificación tanto en composición como en dimensiones. Se trata de implantes estándares muy bien documentados e indicados en muchos casos en el humano. Esto hace que el estudio sea más extrapolable. Las mediciones de estabilidad se realizan colocando un aditamento (Smartpeg®) que se enrosca en la conexión interna que presentan los implantes que se comercializan. Así los resultados ISQ de estabilidad son extrapolables. La mayoría de los estudios que colocan implantes en la tibia del conejo usan implantes estándares de diámetro estrecho entre 3 y 4 mm de diámetro y de 7-10 mm de longitud (148, 149, 150, 151, 152, 88).

5.1.3 Implante SLA/SLActive

La superficie experimental del estudio es la superficie SLActive. La superficie SLActive caracterizada por ser una superficie hidrófila envasada en un medio acuoso basado en suero fisiológico. La composición química es idéntica a la SLA convencional de Titanio grado 4, aunque se diferencia por tener una superficie hidrófila.

La superficie SLA (Sand-blasted Large grit Acid-etched, Chorreada con arena y grabada con ácido) que es nuestra superficie control ha mostrado resultados muy buenos de osteointegración y de supervivencia a largo plazo. Nuestros resultados histomorfométricos también reportan una buena osteointegración para la superficie SLA. La superficie SLA es producida por un proceso de chorreado de arena con partículas de corindón y grabada con ácido HCl/H₂SO₄. Los estudios demuestran su excelente osteointegración y supervivencia a lo largo de 24 años. (4, 5, 6, 11, 39, 41, 53, 117, 119, 158, 159, 160, 161).

El grupo de investigación de ITI realizó durante un tiempo prudente estudios in vitro y en animales probando el comportamiento de la nueva superficie SLActive que en comparación con la otra sólo se diferencia en su propiedad hidrófila. Las conclusiones de los diferentes estudios de la superficie SLActive coinciden en que existe un remodelado óseo acelerado hablando a favor de SLActive. Ésta presentó en un estudio en mini-pigs valores BIC un 60% por encima de SLA a las 2 semanas y mayor cantidad de hueso maduro. (53). Al igual que en nuestro estudio donde los valores de cicatrización de todos momentos analizados (7, 14 y 28 días) son más altos para la superficie SLActive que para la SLA.

En el estudio in vitro de Schneideler y cols 2005 demostraron que la superficie SLActive[®] estimulaba a los osteoblastos y producía una mayor adsorción de fibronectina. (155). En el estudio in vitro de Zhao y cols. 2005 se demuestra también que la producción de osteocalcina es mayor. También se observa que la secreción de factores de crecimiento es mayor y así la remodelación ósea acelerada (113). La superficie SLActive[®] mostró tener hidrofilia en comparación con SLA, menor contaminación de carbonos y energía superficial libre más alta (155). La rigidez y

fuerza de la interfase es significativamente mayor en la superficie SLActive® como también los valores de estabilidad en las fases críticas de osteointegración durante la primeras semanas (156). Los valores ISQ de nuestro estudio también fueron algo mayores en la superficie mejorada.

En un estudio en perros aparece un incremento significativo en el relleno óseo, altura ósea y en el contacto hueso-implante. (131). En nuestro estudio en el conejo el BIC% siempre fue mayor para la superficie SLActive.

5.1.4 Selección de los tiempos de sacrificio

En la búsqueda bibliográfica realizada en Pubmed sólo existe un estudio publicado en el que se estudie la osteointegración de los implantes de superficie SLActive en el conejo neozelandés. Se trata del estudio de Wennerberg en el que se realiza la medición de la osteointegración mediante el análisis del torque de remoción. Los momentos de sacrificio en este estudio es de 28 días y 56 días (163).

El estudio clásico y primero que valoró el comportamiento de la superficie SLActive fue el estudio realizado por Buser y cols en el 2004 (47) en el que se valoró el BIC en el mini pig a las 2,4 y 8 semanas. Otro segundo estudio en el que sí se valora el BIC de la superficie SLActive de implantes colocados en el conejo osteoporótico a los 30 días y 120 días en el conejo es el del grupo de Mardas y Schwarz (163).

Sin embargo existen múltiples estudios que analizan la histomorfometría de otros tipos de implantes colocados en el conejo neozelandés. Los momentos de sacrificio se diferencian en función del objetivo. Si la inserción del implante no conlleva cirugía de regeneración entonces los momentos de sacrificio suelen ser a las 2 semanas y 4

semanas. Si el estudio tiene como objeto evaluar la osteointegración en el hueso osteoporótico el tiempo se prolonga, como también si se ha utilizado material de relleno o regeneración (163, 164, 165, 166).

Consideramos muy interesante valorar en nuestro estudio el comportamiento de estabilidad como el porcentaje de contacto hueso implante en los primeros estadios de cicatrización para valorar si existen diferencias significativas como reporta Schwarz y cols en su estudio en el perro a las 24 horas, 2 días, 4 días, 7 días y 14 días. Por ello decidimos realizar tres grupos de sacrificio. El primer grupo a los 7 días, el segundo a los 14 días y el tercero a los 28 días. (130).

5.1.5 Pruebas histológicas e histomorfométricas

El parámetro decisivo de que exista osteointegración es el contacto hueso-implante (8, 2, 7) y por ello se realizó el análisis del mismo observando la interfase entre la superficie del implante y el tejido óseo circundante. Con la tinción de Levai Laczó se pudo reconocer claramente tejido óseo de tejido no óseo (168). También otros autores utilizaron esta tinción para realizar la histomorfometría en implantes (169).

Para cuantificar los resultados histomorfométricos se determinó el parámetro del BIC% Bone Implant Contact (170). El parámetro BIC representa una pequeña cantidad del hueso circundante al implante, en concreto sólo aquellas partes que tienen contacto directo con el implante. La determinación de este parámetro como método para cuantificar la osteointegración se validó hace tiempo (171, 172, 173).

5.1.6 Diseño y metodología del estudio

La evaluación preclínica de los implantes es una buena forma para valorar el comportamiento de la osteointegración (135). La osteointegración se valora de múltiples formas. En estudios preclínicos de implantes dentales la valoración de la estabilidad con el AFR y la histomorfometría esta muy extendida y aportan mucha información sobre el comportamiento óseo en los diferentes tiempos de cicatrización. En la búsqueda en Pubmed (NCBI) con la palabra clave “dental implant resonance frequency analysis” aparecen 478 resultados de estudios clínicos y preclínicos. Si se ajusta la búsqueda a “dental implant resonance frequency analysis animal” 117. Se trata de un medio diagnóstico no invasivo validado y que aporta gran información. Si el objetivo es valorar la osteointegración desde un punto de vista histológico es necesario realizar histomorfometría.

Realizando la búsqueda de “dental implant histomorphometry” aparecen 260 resultados y añadiendo la palabra “animal” 184. Es complicado desde un punto de vista ético realizar estudios histológicos en el humano, por eso la diferencia de resultados en la búsqueda bibliográfica no es tan significativa como en la estabilidad.

Decidimos valorar la osteointegración a los 7, 14 y 28 días debido a los buenos resultados de cicatrización en los momentos iniciales de la superficie SLActive. Las conclusiones de los diferentes estudios de SLActive coinciden en que existe un remodelado óseo acelerado hablando a favor de la superficie SLActive, valores BIC un 60% por encima de SLA a las 2 semanas y mayor cantidad de hueso maduro (53), estímulo de los osteoblastos y una mayor adsorción de fibronectina. (156), mayor producción de osteocalcina es mayor y de factores de crecimiento (114), valores de estabilidad en las fases críticas durante la primeras semanas (124), incremento de

estructuras vasculares entre el día 1 y 14. (131, 132), incremento de osteocalcina y osteoprotegerina con SLActive® así como un incremento en la producción de factores locales de crecimiento y de vascularización. (158) .

En nuestro estudio se colocaron un total de 36 implantes en 9 conejos que se dividieron en tres grupos de sacrificio (7 días, 14 días y 28 días). Cada grupo constaba de 3 conejos. A cada conejo se le colocaban 4 implantes, 2 implantes de superficie SLA y 2 de superficie SLActive.

5.2 Interpretación de los resultados

El conejo C3 se murió el día de la intervención por intolerancia a los anestésicos y el conejo C5 presentó una sepsis generalizada a los 3 días de la intervención. Teniendo en cuenta que cada conejo llevaba 4 implantes colocados se perdieron 8 implantes. Esto implica una disminución considerable del tamaño muestral, por lo que las diferencias que aparecen en los resultados no son mayores y así estadísticamente no significativas.

5.2.1 Estabilidad de los implantes

La estabilidad primaria de los 28 implantes presenta un valor medio de 64,54. El valor medio de estabilidad primaria para los 14 SLActive fue de 65,43 y para los 14 SLA de 63,57. No resultó ser una diferencia estadísticamente significativa.

El estudio de Romanos reporta valores ISQ de estabilidad primaria algo mayores de entre 70 y 76 ISQ en huesos corticales. Esta diferencia se debe a que son implantes colocados en costillas vacunas que presentan un mayor volumen de hueso cortical que la tibia del conejo (174).

En el estudio clínico de Bornstein de 2009 se reportan valores de estabilidad primaria entre 60 y 80 ISQ para implantes SLActive (175).

El estudio en humanos publicado por Sim y Lang en 2010 describe factores que pueden dar resultados de estabilidad diferentes durante la osteointegración. Se observan valores de estabilidad primaria para implantes SLA que oscilan entre 55 y 74. El valor medio de estabilidad primaria en hueso tipo II fue de 74 y para hueso tipo III/IV fue de 56. Los valores que publica a las semana oscilan para los tipos de hueso II y II/IV siguiendo la clasificación de Lekholm y Zarb entre 70, 7 y 61,9. A las 2 semanas entre 70, 3 y 63,8 y a las 3 semana entre 75,2 y 74. Lo que concluye es que el valor ≥ 55 en el momento de la colocación (estabilidad primaria) es suficiente para conseguir una estabilidad secundaria con éxito. Los valores ISQ varían de predominantemente por la densidad ósea y en menor medida por la longitud del implante. Incrementos de los valores de estabilidad ISQ se muestran en mayor medida cuando el tipo de hueso es de poca densidad (tipo III y IV) (33).

El estudio de Bornstein en el humano muestra que la estabilidad primaria de implantes SLActive colocados en la mandíbula posterior es de 74 y a las 3 y 4 semanas el valor medio de ISQ ronda el valor de 78 (175).

Nuestros resultados de estabilidad secundaria a los 7 días de sacrificio de los implantes con superficie SLActive fue de 72,50 de media y el resultado de la superficie SLA de 60 siendo un resultado estadísticamente significativo. [Media: -12,5; $p=0,004$; IC 95% (-19,24; -5,76)]. A los 14 días de sacrificio el valor medio que se presentó para SLActive fue de 81, 75 y de 84,75 para SLActive. A los 28 días los valores fueron de 79,83 y 82,50. Las diferencias a los 7 y 14 días comparando las dos superficies no fueron estadísticamente significativas. Estos incrementos y descensos entre el día 7, 14 y 28 días no pueden compararse, ya que se tratan de sujetos diferentes. En todos los casos los

valores de estabilidad primaria fueron menores que los de estabilidad secundaria. Este incremento es intrasujeto. Los valores de ISQ más bajos que los reportados por Bornstein probablemente se deben a que los implantes de dicho estudio fueron colocados en un hueso tipo II en la parte posterior de la mandíbula. En nuestro estudio los valores ISQ sólo muestran diferencias significativas entre las superficies en el día 7. La muestra no es muy grande debido a que murió un conejo que debía sacrificarse a los 7 días. En el día 14 y 28 los valores ISQ, aunque siempre sean algo mayores en la superficie SLActive, no presentan diferencias entre la superficie SLA y SLActive.

5.2.2 Histomorfometría BIC

El análisis histomorfométrico comparando las superficie SLA y SLActive de forma **global** presenta resultados estadísticamente significativos. La diferencia entre ambos grupos fue **estadísticamente significativa** a favor de la superficie SLActive. Se observa que en todos los momentos analizados existe contacto de hueso con las superficies de los implantes. Los resultados de porcentaje de contacto hueso implante son mayores en tiempos de sacrificio mayores, siendo los valores más altos en los implantes analizados del día 28.

A los 7 días los resultados entre una superficie y otra muestran una diferencia estadísticamente no significativa, aunque el valor BIC% es mayor en la superficie SLActive. **A los 14 días** la media del porcentaje BIC para la superficie SLActive fue de 38,95% (SD 2,49) frente a la media de SLA que fue de 29,84% (SD 4,78). El resultado de cambio de BIC es **estadísticamente significativo**. **Y a los 28 días** no muestra una diferencia estadísticamente significativa, aunque si una tendencia a favor de la superficie SLActive.

En el estudio de Schwarz y cols. 2007 realizado en el perro los resultados histomorfométricos en el día 1 y 4 no mostraban resultados estadísticamente significativos, pero sí se observaban imágenes diferentes. En la superficie SLActive aparecen en el día 1 un coágulo estabilizado mientras en la superficie SLA el coágulo aparecía parcialmente colapado. En el día 4 aparecen indicios de presencia de osteocalcina, mientras que sobre la superficie SLA sólo existe infiltrado inflamatorio. En el día 7 describe sobre la superficie SLActive hueso inmaduro y osteocalcina y en el día 14 aparece hueso con estructuras ya organizadas formando osteones. Los valores BIC que reporta para estos diferentes días son en el día 1 de sacrificio del animal de 35 para SLAa y de 36,5 para SLAactive, en el día 4 se mantiene igual. En el día 7 el valor de SLAactive es de 54 frente a 41 de SLA. El día 14 el valor de porcentaje de contacto hueso implante BIC asciende a 68 para SLAactive y a 55 para SLA (130, 131, 132).

Si comparamos estos valores resulta llamativo que en el día 7 los resultados de SLAactive en nuestro estudio y en el de Schwarz presentan una gran diferencia con los de la superficie SLA hidrófoba. Esto demuestra de nuevo que la superficie hidrófila y con una mayor energía superficial acelera la nueva formación de hueso sobre la superficie del implante.

En el estudio de Bornstein de 2008 se observa que la superficie SLActive obtiene resultados histomorfométricos un 25% mayores a las 2 semanas que la superficie SLA (176).

Schwarz y cols en 2008 valoran también el comportamiento de la superficie en zonas regenerables y concluye que la superficie SLActive promueve la regeneración y acelera su maduración. Obtiene resultados de relleno óseo completo a las 8 semanas con la superficie SLActive (133).

Lai y cols demuestran que el relleno de defectos circunferenciales de menos de 1 mm de anchura es igual a las 8 semanas para ambas superficies, pero el valor de porcentaje hueso implante BIC es mayor para SLActive a las 2 y 4 semanas (123).

El estudio de Lang y cols de 2011 realizado en humanos en el que se valora histomorfométricamente el comportamiento de los implantes de superficie SLActive concluye que los patrones de cicatrización de la superficie SLA y SLActive son similares. El porcentaje de contacto hueso implante BIC es mayor a los 14 días y de forma significativa a los 28 días si se compara la superficie SLActive con la superficie SLA. La tasa de osteointegración es sustancialmente más lenta en el humano que en el animal (127).

Al igual que en los estudios anteriormente mencionados los resultados histomorfométricos de nuestro estudio demuestran que los valores de contacto hueso implante siempre son mayores en los implantes de superficie SLActive, tanto en el día 7, 14 y 28, aunque sólo exista diferencia significativa en el día 14. El análisis global sí muestra diferencia estadísticamente significativa entre las dos superficies. Estas diferencias probablemente serían significativas si el tamaño muestral fuera algo mayor.

6. Conclusiones / Conclusions

- 1. El modelo animal del conejo neozelandés es válido para la realización de estudios sobre la osteointegración de implantes dentales.**

The newzealand rabbit is a valid animal model for research in dental implant osseointegration.

- 2. Los resultados globales de porcentaje de contacto hueso implante BIC% analizados en conjunto sin separar los diferentes momentos de osteointegración muestran diferencias estadísticamente significativas a favor de la superficie SLActive.**

The global histomorphometric results in our study demonstrate significant differences in bone to implant BIC% values in favor of SLActive ® surface.

- 3. La superficie SLActive® de Straumann presenta mejores valores de estabilidad ISQ en los momentos iniciales de cicatrización, en el día 7. Los valores de estabilidad a los 14 y 28 días son similares para las dos superficies.**

On day 7 stability ISQ values were higher for SLActive implants than for SLA.

On day 0, 14 and 28 the results for both surfaces were similar.

- 4. La superficie SLActive® de Straumann presenta diferencias estadísticamente significativas en los resultados histomorfométricos a los 14 días de osteointegración. En el día 7 y 28 también existen diferencias a favor de la superficie SLActive.**

On day 14 histomorphometric results were significantly higher for the experimental surface SLActive. On day 7 and 28 BIC% values were also higher for SLActive implants.

7. Limitaciones del estudio

Como todo procedimiento experimental, este estudio no está exento de limitaciones. La principal limitación de este estudio fué la utilización de un número reducido de animales. Por un lado ésto supuso que no se haya podido probar un mayor número de implantes y osteointegración, ya que el número de implantes a colocar en cada animal es limitado, y que algunos de los resultados no hayan presentado diferencias estadísticamente significativas, que posiblemente con una mayor potencia estadística, si hubieran existido. No obstante hemos de considerar que la tendencia actual dentro de la utilización de animales de experimentación es utilizar el menor número de animales posible para llevar a cabo estudios científicos.

8. Referencias bibliográficas

1. Donado Rodriguez M, Martinez Gonzalez JM. 4ª Edición Cirugía Bucal Patología y Técnica. 2013.
2. Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scan J Plastic and Reconst Surg.* 1969;3(2):81-100.
3. Schroeder AP, O. Sutter, F. Gewebsreaktion auf ein Titan-Hohlzylinderimplantat mit Titan-Spritzschichtoberfläche. *Schweiz Monat Zahnh.* 1976;86:713-27.
4. Bornstein MM, Lussi A, Schmid B, Belser U, Buser D. Early loading of non-submerged titanium implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: 3-year results of a prospective study in partially edentulous patients. *Int J Oral Maxillofac Impl* 2003; 18: 659-666.
5. Buser D, Meriscke-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, Belser UC, Lang NP. Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: A 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Impl Res* 1997; 8: 161-172.
6. Buser D, Nydegger T, Hirt HP, Cochran DL, Nolte LP. Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998; 13(5): 611-619.
7. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983 Sep;50(3):399-410.
8. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta orthop Scand.* 1981;52(2):155-70.
9. Schroeder AP, O. Sutter, F. Gewebsreaktion auf ein Titan-Hohlzylinderimplantat mit Titan-Spritzschichtoberfläche. *Schweiz Monat Zahnh.* 1976;86:713-27.
10. Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg.* 1981 Feb;9(1):15-25.

11. Zarb GAA, T. Osseointegration - A requiem for the periodontal ligament? Editorial. *Int J Periodont Restorative Dent*. 1991;11:88-91.
12. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral implants Res*. 2003 Jun;14(3):251-62
13. Davies JE. In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anatom rec*. 1996 Jun;245(2):426-45.
14. Lindhe J, Karring T, Lang N. *Clin Period Implant Dent*: Blackwell Munksgaard; 2003.
15. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontology* 2000. 1998 Jun;17:22-35.
16. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat med*. 2003 Jun;9(6):677-84.
17. Vladimirov BS, Dimitrov SA. Growth factors-importance and possibilities for enhancement of the healing process in bone fractures. *Fol med*. 2004;46(2):11-7
18. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical oral implants research*. 2003 Jun;14(3):251-62.
19. Lindhe J, Karring T, Lang N. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*: Blackwell Munksgaard; 2003. *J cel bioch*. 1994 Nov;56(3):340-7.
20. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of dental education*. 2003 Aug;67(8):932-49.
21. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical oral implants research*. 2003 Jun;14(3):251-62. 20.
22. Boyan BD, Lossdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cells Mater*. 2003 Oct 24;6:22-7.
23. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. *Periodontology* 2000. 1998 Jun;17:22-35.
24. Steinemann SG. Titanium-the material of choice? *Periodontology* 2000. 1998 Jun;17:7-21.

25. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotech.* 2010 Apr;28(4):198-206.
26. Johansson CB, Hansson HA, Albrektsson T. Qualitative interfacial study between bone and tantalum, niobium or commercially pure titanium. *Biomaterials.* 1990 May;11(4):277-80.
27. Al-Nawas B, Domagala P, Fragola G, Freiburger P, Ortiz-Vigón A, Rousseau P, Tondela J. A prospective non-interventional study to evaluate survival and success of reduced diameter implants made from titanium-zirconium alloy. *J Oral Impl*, submitted. PMID:24666383.
28. Quirynen M, Al-Nawas B, Meijer HJA, Razavi A, Reichert TE, Schimmel M, Storelli S, Romeo E. Small-diameter titanium Grade IV & titanium-13zirconium implants in edentulous mandibles: 3-year results from a double-blind, randomized controlled trial. *Clin Oral Implants Res*, accepted. PMID:247348.
29. Benic GI, Gallucci GO, Mokti M, Hammerle CHF, Weber H-P, Jung RE. Titanium-zirconium narrow diameter versus titanium regular diameter implants for anterior and premolar single crowns: 1-year results of a randomized controlled clinical study. *J Clin Periodontol.* 2013 Nov;40(11):1052-61.
30. Gottlow J, Dard M, Kjellson F, Obrecht M, Sennerby L. Evaluation of a new titanium-zirconium dental implant: a biomechanical and histological comparative study in the mini pig. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012 Aug;14(4):538-45.
31. Barter S, Stone P, Brägger U. A pilot study to evaluate the success and survival rate of titanium-zirconium implants in partially edentulous patients: *Clin Oral Implants Res.* 2012 Jul;23(7):873-81.
32. Baron R. *Anatomy and Biology of Bone Matrix and Cellular Elements. General Principles of Bone Biology. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral research.* Washington, DC. USA 2003.
33. Sim CP1, Lang NP. Factors influencing resonance frequency analysis assessed by Osstell mentor during implant tissue integration: I. Instrument positioning, bone structure, implant length. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Jun;21(6):598-604.
34. Kapur KK. Veterans Administration Cooperative Dental Implant Study - comparisons between fixed partial dentures supported by bladevent implants and removable partial dentures. Part II: Comparisons of success rates and periodontal health between two treatment modalities. *J Prost dent.* 1989 Dec;62(6):685-703.

35. Smithloff M, Fritz ME. The use of blade implants in a selected population of partially edentulous adults. A 15-year report. *J Periodontol.* 1987 Sep;58(9):589-93.
36. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cells Mater.* 2007;13:1-10. 29.
37. Albrektsson T. Hard tissue implant interface. *Austral Dent J.* 2008 Jun;53 Suppl 1:S3-8.
38. Wieland M, Sittig C, Brunette DM, Textor M, Spencer ND. Measurement and evaluation of the chemical composition and topography of titanium implant surfaces. In: Davies JE, editor. *Bone engineering*. Toronto, Canada: em squared Inc.; 2000. p 163–182.
39. Li D, Ferguson SJ, Beutler T, Cochran DL, Sittig C, Hirt HP, et al. Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants. *J Biomed Mater Res.* 2002 May;60(2):325-32.
40. Ivanoff CJ, Widmark G, Johansson C, Wennerberg A. Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jawbone. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 2003 May-Jun;18(3):341-8.
41. Cochran DL, Buser D, ten Bruggenkate CM, Weingart D, Taylor TM, Bernard JP, et al. The use of reduced healing times on ITI implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: early results from clinical trials on ITI SLA implants. *Clin Oral Impl Res.* [Clinical Trial Multicenter Study]. 2002 Apr;13(2):144-53.
42. Dohan Ehrenfest DM, Coelho PG, Kang BS, Sul YT, Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends Biotech.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Review].
43. Novaes AB, Jr., Papalexiou V, Muglia V, Taba M, Jr. Influence of interimplant distance on gingival papilla formation and bone resorption: clinical-radiographic study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 2006 Jan-Feb;21(1):45-51.
44. Gotfredsen K, Nimb L, Hjorting-Hansen E, Jensen JS, Holmen A. Histomorphometric and removal torque analysis for TiO₂-blasted titanium implants. An experimental study on dogs. *Clin Oral Impl Res.* [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1992 Jun;3(2):77-84.

45. Morra M, Cassinelli C, Bruzzone G, Carpi A, Di Santi G, Giardino R, et al. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface analysis. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 2003 Jan-Feb;18(1):40-5.
46. Boyan BD, Bonewald LF, Paschalis EP, Lohmann CH, Rosser J, Cochran DL, et al. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcified Tissue Int.*
47. Novaes AB, Jr., Souza SL, de Oliveira PT, Souza AM. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 2002 May-Jun;17(3):377-83.
48. Gottlander M, Johansson CB, Albrektsson T. Short- and long-term animal studies with a plasma-sprayed calcium phosphate-coated implant. *Clin Oral Impl Res.* 1997 Oct;8(5):345-51.
49. Abrahamsson I, Albouy JP, Berglundh T. Healing at fluoride-modified implants placed in wide marginal defects: an experimental study in dogs. *Clin Oral Impl Res.* 2008 Feb;19(2):153-9.
50. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodont.* 1991 Nov;62(11):710-6.
51. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, Gomez-Pellico L, Blanco L, Alobera MA, et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Impl Res.* 2002 Dec;13(6):631-6.
52. Abdel-Haq J, Karabuda CZ, Arisan V, Mutlu Z, Kurkcu M. Osseointegration and stability of a modified sand-blasted acid-etched implant: an experimental pilot study in sheep. *Clin Oral Impl Res.* 2011 Mar;22(3):265-74.
53. Buser, D., Broggini, N., Wieland, M., Schenk, R.K., Denzer, A.J., Cochran, D.L., Hoffmann, B., Lussi, A. & Steinemann, S.G. (2004) Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 83: 529–533.
54. Zhao, G., Schwartz, Z., Wieland, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D.L. & Boyan, B.D. (2005) High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res* 74: 49–58.

55. Rupp, F., Scheideler, L., Olshanska, M., Wieland, M. & Geis-Gerstorfer, J. (2005) Chemical modification influences roughness and contamination induced hydrophobicity of microstructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res* 76: 323–334.
56. Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z, Zhao G, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, et al. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *J Biomed Mater Res Part B, Applied Biomater.* 2009 Feb;88(2):544-57.
57. Kloss FR, Steinmüller-Nethl D, Stigler RG, Ennemoser T, Rasse M, Hachl O. In vivo investigation on connective tissue healing to polished surfaces with different surface wettability. *Clin Oral Impl Res.* 2011 Jul;22(7):699-705.
58. Kloss FR, Steinmüller-Nethl D, Stigler RG, Ennemoser T, Rasse M, Hachl O. In vivo investigation on connective tissue healing to polished surfaces with different surface wettability. *Clin Oral Impl Res.* 2011 Jul;22(7):699-705.
59. Sennerby L, Roos J. Surgical determinants of clinical success of osseointegrated oral implants: a review of the literature. *Int J Prost [Review].* 1998 Sep-Oct;11(5):408-20.
60. Jacobs R. Preoperative radiologic planning of implant surgery in compromised patients. *Periodontology* 2000. [Review]. 2003;33:12-25.
61. Friberg B, Sennerby L, Linden B, Grondahl K, Lekholm U. Stability measurements of one-stage Branemark implants during healing in mandibles. A clinical resonance frequency analysis study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1999 Aug;28(4):266-72.
62. Salyer KE, Taylor DP. Bone grafts in craniofacial surgery. *Clin Plast Surg.* 1987 Jan;14(1):27-35.)
63. Margolin MD, Cogan AG, Taylor M, Buck D, McAllister TN, Toth C, et al. Maxillary sinus augmentation in the non-human primate: a comparative radiographic and histologic study between recombinant human osteogenic protein-1 and natural bone mineral. *J Periodontology.* [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1998 Aug;69(8):911-9.
64. Klijn RJ, Hoekstra JW, Van Den Beucken JJ, Meijer GJ, Jansen JA. Maxillary sinus augmentation with microstructured tricalcium phosphate ceramic in sheep. *Clin Oral Impl Res.* 2011 Apr 13.

65. Simonpieri A, Choukroun J, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. Simultaneous sinus--lift and implantation using microthreaded implants and leukocyte and platelet-rich fibrin as sole grafting material: a six-year experience. *Impl Dent*. 2011 Feb;20(1):2-12.
66. O'Sullivan D, Sennerby L, Jagger D, Meredith N. A comparison of two methods of enhancing implant primary stability. *Clin Impl Dent Rel Res*. 2004;6(1):48-57.
67. Sevimay M, Turhan F, Kilicarslan MA, Eskitascioglu G. Three dimensional finite element analysis of the effect of different bone quality on stress distribution in an implant-supported crown. *J Prost Dent*. 2005 Mar;93(3):227-34.
68. Pilliar RM, Lee JM, Maniopoulos C. Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. *Clin Orthop Rel Res*. 1986 Jul(208):108-13.
69. Soballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Bunger C. Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants. *Journal Bone Joint Surg. British volume*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1993 Mar;75(2):270-8.
70. Cehreli MC, Karasoy D, Akca K, Eckert SE. Meta-analysis of methods used to assess implant stability. *Int J Oral Maxillofac Impl*. 2009 Nov-Dec;24(6):1015-32.
71. Ganeles et al. Bea. Höhere Sicherheit und schnellere Osseointegration für jede Indikation. [página web] 2008, 2010; Available from:
72. <http://www.straumann.de/de-index/products/products-slactive-new/products-1.htm>).
73. Olive J, Aparicio C. Periotest method as a measure of osseointegrated oral implant stability. *Int J Oral Maxillofac Impl*. 1990 Winter;5(4):390-400.
74. Mijiritsky E, Mardinger O, Mazor Z, Chaushu G. Immediate provisionalization of single-tooth implants in fresh-extraction sites at the maxillary esthetic zone: up to 6 years of follow-up. *Impl Dent*. 2009 Aug;18(4):326-33.
75. Schwartz-Arad D, Chaushu G. Immediate implant placement: a procedure without incisions. *J Periodontol*. 1998 Jul;69(7):743-50.
76. Degidi M, Piattelli A. 7-year follow-up of 93 immediately loaded titanium dental implants. *J Oral Impl*. 2005;31(1):25-31.
77. Crespi R, Cappare P, Gherlone E, Romanos GE. Immediate versus delayed loading of dental implants placed in fresh extraction sockets in the maxillary

- esthetic zone: a clinical comparative study. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 2008 Jul-Aug;23(4):753-8.
78. Crespi R, Cappare P, Gherlone E, Romanos GE. Immediate occlusal loading of implants placed in fresh sockets after tooth extraction. *IntJ Oral Maxillofac Impl* 2007 Nov- Dec;22(6):955-62.
 79. Pieri F, Aldini NN, Fini M, Corinaldesi G. Immediate occlusal loading of immediately placed implants supporting fixed restorations in completely edentulous arches: a 1-year prospective pilot study. *J Periodontol.* 2009 Mar;80(3):411-21.
 80. Hui E, Chow J, Li D, Liu J, Wat P, Law H. Immediate provisional for single-tooth implant replacement with Branemark system: preliminary report. *Clin Impl Dent Rel Res.* 2001;3(2):79-86.
 81. Javed F, Romanos GE. The role of primary stability for successful immediate loading of dental implants. A literature review. *J Dent.* 2010 Aug;38(8):612-20.
 82. Degidi M, Piattelli A. 7-year follow-up of 93 immediately loaded titanium dental implants. *J Oral Impl.* 2005;31(1):25-31.
 83. Buser D1, Janner SF, Wittneben JG, Brägger U, Ramseier CA, Salvi GE. 10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303 partially edentulous patients. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012 Dec;14(6):839-51.
 84. Morton D1, Bornstein MM, Wittneben JG, Martin WC, Ruskin JD, Hart CN, Buser D. Early loading after 21 days of healing of nonsubmerged titanium implants with a chemically modified sandblasted and acid-etched surface: two-year results of a prospective two-center study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010 Mar;12(1):9-17.
 85. Atsumi M, Park SH, Wang HL. Methods used to assess implant stability: current status. *Int J Oral Maxillofac Impl* 2007 Sep-Oct;22(5):743-54.
 86. Adell R. Tissue integrated prostheses in clinical dentistry. *Int Dent J.* 1985 Dec;35(4):259-65.
 87. Branemark P. Ten-year survival rates of fixed prostheses on four or six implants ad modum Brånemark in full edentulism. *Clin Oral Impl Res* 1995.
 88. Elias JJ, Brunski JB, Scarton HA. A dynamic modal testing technique for noninvasive assessment of bone-dental implant interfaces. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 1996 Nov-Dec;11(6):728-34.

89. Meredith N., A.D.C.P., Quantitative determination of the stability of the implant-tissue using resonance frequency analysis. *Clin Oral Impl Res.* 1996. 261-267.
90. Cehreli MC, Karasoy D, Akca K, Eckert SE. Meta-analysis of methods used to assess implant stability. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 2009 Nov-Dec;24(6):1015-32.
91. Gedrange T, Hietschold V, Mai R, Wolf P, Nicklisch M, Harzer W. An evaluation of resonance frequency analysis for the determination of the primary stability of orthodontic palatal implants. A study in human cadavers. *Clin Oral Impl Res.* 2005 Aug;16(4):425-31. 77.
92. Valderrama P, Oates TW, Jones AA, Simpson J, Schoolfield JD, Cochran DL. Evaluation of two different resonance frequency devices to detect implant stability: a clinical trial. *J Periodontol.* 2007 Feb;78(2):262-72. 78.
93. Aparicio C, Lang NP, Rangert B. Validity and clinical significance of biomechanical testing of implant/bone interface. *Clin Oral Impl Research.* 2006 Oct;17 Suppl 2:2-7.
94. Lachmann S, Jäger B. Axmann D, Gómez-Román G, Groten M, Weber H. Resonance frequency analysis and damping capacity assessment. Part I: an in vitro study on measurement reliability and a method of comparison in the determination of primary dental implant stability. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(1):75-9. 16.
95. Ersanli S, Karabuda C, Beck F, Leblebicioglu B. Resonance Frequency Analysis of One-Stage Dental Implant Stability During the Osseointegration Period. *J Periodontol* 2005; 76(7):1066-71.
96. Huang HM, Chiu CL, Yeh CY, Lin CT, Lin LH, Lee SY. Early detection of implant healing process using resonance frequency analysis. *Clin Oral Res* 2003;14:437-43.
97. Da Cunha HA, Francischon CE, Filho HN, de Oliveira RC. A Comparison Between Cutting Torque and Resonance Frequency in the Assessment of Primary Stability and Final Torque Capacity of Standard and TiUnite Single-Tooth Implants Under Immediate Loading. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(4):578-85.
98. Lachmann S, Jäger B. Axmann D, Gómez-Román G, Groten M, Weber H. Resonance frequency analysis and damping capacity assessment. Part I: an in vitro

- study on measurement reliability and a method of comparison in the determination of primary dental implant stability. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(1):75-9. 18.
99. Lachmann S, Laval JY, Jäger B, Axmann D, Gómez-Román G, Groten M, Weber H. Resonance frequency analysis and damping capacity assessment. Part 2: peri-implant bone loss follow-up. An in vitro study with the Periotest and Osstell instruments. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(1):80-4.
 100. Yamaguchi M, Xu H, Shimizu Y, Hatano N, Ooya K. Resonance frequency analysis of long-term implant success in the posterior partially edentulous mandible. *Quintessence Int* 2008;39(3):121-5.
 101. Shiigai T. Pilot study in the identification of stability values for determining immediate and early loading of implants. *J Oral Implantol* 2007;33(1):13-22.
 102. Glauser R, Sennerby L, Meredith N, Reé A, Lundgren A, Gottlow J, Hämmerle CH. Resonance frequency analysis of implants subjected to immediate or early functional occlusal loading. Successful vs. failing implants. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(4):428-34.
 103. Sennerby L, Meredith N. Implant stability measurements using resonance frequency analysis: biological and biomechanical aspects and clinical implications. *Periodontol* 2000. 2008;47:51-66.
 104. Lindh C, Nilsson M, Klinge B, Petersson A. Quantitative computed tomography of trabecular bone in the mandible. *Dent maxillofac Rad.* 1996 Jun;25(3):146-50.
 105. Gray CF, Redpath TW, Smith FW. Pre-surgical dental implant assessment by magnetic resonance imaging. *J Oral Impl.* 1996;22(2):147-53.
 106. Morinaga K, Kido H, Sato A, Watazu A, Matsuura M. Chronological changes in the ultrastructure of titanium-bone interfaces: analysis by light microscopy, transmission electron microscopy, and micro-computed tomography. *Clin Implant dentistry and related research.* 2009 Mar;11(1):59-68.
 107. Dahlin C, Johansson CB. Osseointegration of implants. *Osteology Guidelines for Oral and Maxillofacial Regeneration. Preclinical Models for translational Research.* Quintessence Publishing. 2011(8):103-122.
 108. Schlegel KA, Lutz R, Wehrhan F. *Osteology Guidelines for Oral and Maxillofacial Regeneration. Preclinical Models for translational Research.* Quintessence Publishing. 2011(12):190-191.

109. Hall J, Miranda-Burgos P, Sennerby L. Stimulation of directed bone growth at oxidized titanium implants by macroscopic grooves: an in vivo study. *Clin Impl Dent Rel Res*. 2005;7 Suppl 1:76-82.
110. Albrektsson T, Sennerby L. State of the art in oral implants. *J Clin Periodontol*. 1991 Jul;18(6):474-81.
111. Molly L. Bone density and primary stability in implant therapy. *Clin Oral Impl Res*. 2006 Oct;17 Suppl 2:124-35.
112. Buser D., Broggini N., Wieland M. , Schenk R.K., Denzer A.J. , Cochran D.L., Hoffmann B., Lussi A., Steinemann S.G. Mejora de la aposición ósea sobre una superficie de titanio químicamente modificada. *J Dent Res* 2004: 83 (7); 529-533
113. Massaro C, Baker MA, Cosentino F, Ramires PA, Klose S, Milella E. Surface and biological evaluation of hydroxiapatite-based coatings on titanium deposited by different techniques. *J Biomed Mater Res* 2001; 58(6):651-7.
114. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res* 2005;74A(1):49–58
115. Ratner and Porter, 1996 48. Ratner BD, Porter SC, Surfaces in biology and biomaterials; description and characterization. In: Interfacial phenomena and bioproducts. Brash JLW Editor. New York: Marcel Dekker, pp. 57-83.
116. Wieland M, Sittig C, Brunette DM, Textor M, Spencer ND. 2000 Measurement and evaluation of the chemical composition and topography of titanium implant surfaces. In: Bone Engineer. Davies JE, editor. Toronto: em squared inc., pp. 163-182.
117. Buser, D., Schenk, R.K., Steinemann, S., Fiorellini, J.P., Fox, C.H. & Stich, H. (1991) Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 25: 889–902.
118. Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to loaded and unloaded implants with a sandblasted and acid-etched surface : a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res* 1998; 40:1-2.
119. Buser D, Nydegger T, Oxland T, Cochran DL, Schenk RK, Hirt HP, Nolte LP. Interface shear strength of titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A biomechanical study in the maxilla of miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1999; 45:75-83.

120. Rocuzzo M, Bunino M, Prioglio F, Bianchi SD. Early loading of sandblasted and acid-etched (SLA) implants: a prospective split-mouth comparative study. *Clin Oral Impl Res* 2001; 12: 572-578.
121. Kilpadi DV, Lemons JE. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *J Biomed Mater Res* 1994; 28(12):1419- 1425.
122. Rupp, F., Scheideler, L., Olshanska, N., de Wild, M., Wieland, M., Geis-Gerstorfer, J., 2006. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J Biomed Mater Res. A* 76, 323–334.
123. Lai, H.C., Zhuang, L.F., Zhang, Z.Y., Wieland, M., Liu, X., 2009. Bone apposition around two different sandblasted, large-grit and acid-etched implant surfaces at sites with coronal circumferential defects: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 20, 247–253.
124. Ferguson, S.J., Broggin, N., Wieland, M., de Wild, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D.L., Buser, D., 2006. Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface. *J Biomed Mater Res. A* 78, 291–297.
125. Gottlow, J., Dard, M., Kjellson, F., Obrecht, M., Sennerby, L., 2012. Evaluation of a new titanium-zirconium dental implant: a biomechanical and histological comparative study in the mini pig. *Clin Implant Dent Relat. Res.* 14, 538–545.
126. Schwarz F1, Herten M, Sager M, Bieling K, Sculean A, Becker J. Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Apr;18(2):161-70
127. Lang, N.P., Salvi, G.E., Huynh-Ba, G., Ivanovski, S., Donos, N., Bosshardt, D.D., 2011. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin. Oral Implants Res.* 22, 349–356.
128. Bornstein, M.M., Heynen, G., Bosshardt, D.D., Buser, D. Effect of two bioabsorbable barrier membranes on bone regeneration of standardized defects in calvarial bone: a comparative histomorphometric study in pigs. *J Periodontol.* 2009 80: 1289–1299.
129. Lang, N.P., Salvi, G.E., Huynh-Ba, G., Ivanovski, S., Donos, N., Bosshardt, D.D., 2011. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin. Oral Implants Res.* 22, 349–356.
130. Schwarz, F., Ferrari, D., Herten, M., Mihatovic, I., Wieland, M., Sager, M.,

- Becker, J., 2007a. Effects of surface hydrophilicity and microtopography on early stages of soft and hard tissue integration at non-submerged titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. *J Periodontol.* 78, 2171–2184.
131. Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Wieland, M., Dard, M., Becker, J., 2007b. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs. *Clin Oral Implants Res.* 18, 481–488.
132. Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Wieland, M., Dard, M., Becker, J., 2007c. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early subepithelial connective tissue attachment at chemically modified and conventional SLA titanium implants. A pilot study in dogs. *Clin Oral Investig.* 11, 245–255.
133. Schwarz, F., Sager, M., Ferrari, D., Herten, M., Wieland, M., Becker, J., 2008. Bone regeneration in dehiscence-type defects at non-submerged and submerged chemically modified (SLActive) and conventional SLA titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. *J Clin Periodontol.* 35, 64–75.
134. de Sanctis, M., Vignoletti, F., Discepoli, N., Zucchelli, G., Sanz, M., 2009. Immediate implants at fresh extraction sockets: bone healing in four different implant systems. *J Clin Periodontol.* 36, 705–711.
135. Neyt JG, Buckwalter JA, Carrol NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J* 1988, 18: 118-123.
136. Gilsanz V1, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, Boechat MI. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol.* 1988 Oct;255(4 Pt 1):E416-21.
137. Giannobile WV, Nevins M. Osteology Guidelines for Oral and Maxillofacial Regeneration, Preclinical models for Translational Research. 106-108.
138. Eitel F, Seiler H, Schweiberer L Morphologic examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure. I. Research methods (author's transl) *Unfallheilkunde.* 1981 Jun;84(6):250-4.
139. Hörner K1, Loeffler K, Holtzmann M. Comparison of the histologic structure of the compact bone of the long hollow bones of mouse, hamster, rat, guinea pig, rabbit, cat, and dog during development. *Anat Histol Embryol.* 1997 Dec;26(4):289-95.
140. Hönig JF, Merten HA. Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der humanmedizinischen osteologischen Grundlagenforschung. *Z Zahnärztl*

Implantol 1993 Sept., 244-254

141. Brunski JB. In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface. *Adv Dent Res.* 1999; 13, 99-119.
142. Dean JC, Tisdell CL, Goldberg VM, Parr J, Davy D, Stevenson S. Effects of Hydroxyapatite Tricalcium Phosphate Coating and Intracancellous Placement on Bone Ingrowth in Titanium Fibermetal Implants. *J Arthroplasty* 1995 Oct (6), 830-838.
143. D'lima DD, Lemperle SM, Chen PC, Holmes RE, Colwell CW. Bone response to implant surface morphology. *J Arthroplasty* 1998. (13) 8, 928-934
144. Feighan JE., Goldberg VM, Davy D, Parr JA, Stevenson S. The Influence of Surface-Blasting on the Incorporation of Titanium-Alloy Implants in a Rabbit Intramedullary Model. *J Bone Joint Surg* 1995. (77) 9, 1380-1395.
145. Wissing H, Stürmer KM, Breidenstein G. Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspecies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Unfallheilkunde* 1990. (212) 479-488.
146. Goldberg VM, Stevenson S, Feighan J, Davy D. Biology of grit-blasted titanium alloy implants. *Clin Orthop* 1995. (319) 122-129.
147. Donath K.: The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue Sage-Schiff (sawing and grinding technique). *Pathol. Res. Pract.* 1985.179; 6, 631-633.
148. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MV. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir Bras.* 2005;20:28–34.
149. Petroianu A. Ethical Aspects of Animal Research. *Acta Cir Bras.* 1996;11:157–64.
150. Grandfield K, Palmquist A, Engqvist H. Three-dimensional structure of laser-modified Ti6Al4V and bone interface revealed with STEM tomography. *Ultramicroscopy* 2012 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultramic.2012.07.007>
151. Liu Q, Liu X, Liu BL, Hu KJ, Zhou XD, Ding YX. The effect of low-intensity pulsed ultrasound on the osseointegration of titanium dental implants. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 50, 244-250.
152. Park JW. Increased bone apposition on a titanium oxide surface incorporating phosphate and strontium. *Clin Oral Implants Res* 2011; 22, 230-4.
153. Reigstad O, Johansson C, Stenport V, Wennerberg A, Reigstad A, Rokkum, M.

- Different patterns of bone fixation with hydroxyapatite and resorbable CaP coatings in the rabbit tibia at 6, 12, and 52 weeks. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; 99, 14-20.
154. Palmquist A, Lindberg F, Emanuelsson L, Branemark R, Engqvist H, Thomsen P. Biomechanical, histological, and ultrastructural analyses of laser micro- and nano-structured titanium alloy implants: a study in rabbit. *J Biomed Mater Res* 2010; 92, 1476-86.
 155. Lee JE, Heo SJ, Koak JY, Kim S K, Han CH, Lee, S. J. Healing response of cortical and cancellous bone around titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24, 655-62.
 156. Scheideler R, Rupp F, Wieland M, Geis-Gerstorfer J. Storage conditions of titanium implants influence molecular and cellular interactions. 83rd General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research (IADR), March 9-12 2005, Baltimore, MD, USA; Abs #870.
 157. Ferguson SJ, Broggini N, Wieland M, de Wild M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Buser D. Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface. *J Biomed Mater Res A* 2006;78(2):291-297.
 158. Rausch-Fan X, Qu Z, Wieland M, Matejka M, Schedle A. Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (MG63) in response to titanium surfaces. *Dent Mater* 2008;24(1):102-110.
 159. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*. 1998 Dec;19(23):2219-32.
 160. Kieswetter K1, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD, Boyan BD. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res*. 1996 Sep;32(1):55-63.
 161. Martin JY1, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63).

- J Biomed Mater Res. 1995 Mar;29(3):389-401.
162. Gahlert M1, Gudehus T, Eichhorn S, Steinhauser E, Kniha H, Erhardt W.
Biomechanical and histomorphometric comparison between zirconia implants with varying surface textures and a titanium implant in the maxilla of miniature pigs. Clin Oral Implants Res. 2007 Oct;18(5):662-8. Epub 2007 Jun 30.
 163. Wennerberg A1, Jimbo R, Stübinger S, Obrecht M, Dard M, Berner S.
Nanostructures and hydrophilicity influence osseointegration: a biomechanical study in the rabbit tibia. Clin Oral Implants Res. 2014 Sep;25(9):1041-50.
 164. Mardas N, Schwarz F, Petrie A, Hakimi AR, Donos N. The effect of SLActive surface in guided bone formation in osteoporotic-like conditions. Clin Oral Implants Res. 2011 Apr;22(4):406-15.
 165. Barak S, Neuman M, Iezzi G, Piattelli A, Perrotti V, Gabet Y. A new device for improving dental implants anchorage: a histological and micro-computed tomography study in the rabbit. Clin Oral Implants Res. 2015
 166. Wen B, Kuhn L, Charles L, Pendrys D, Shafer D, Freilich M. Time-dependent periimplant bone reaction of acidic monomer-treated injection molded zirconia implants in rabbit tibiae. Implant Dent. 2015 Jun;24(3):287-93.
 167. Duyck J1, Roesems R, Cardoso MV, Ogawa T, De Villa Camargos G, Vandamme K. Effect of insertion torque on titanium implant osseointegration: an animal experimental study. Clin Oral Implants Res. 2015 Feb;26(2):191-6.
 168. Laczko J, Levai G. A Simple Differential Staining Method (I for Semi-thin Sections of Ossifying Cartilage and Bone Tissues Embedded in Epoxy Resin. Mikroskopie. 1975; 31 (8): 1-4.
 169. Blanco J1, Alvarez E, Muñoz F, Liñares A, Cantalapiedra A. Influence on early osseointegration of dental implants installed with two different drilling protocols: a histomorphometric study in rabbit. Clin Oral Implants Res. 2011 Jan;22(1):92-9.
 170. Tonino AJ1, Thérin M, Doyle C. Hydroxyapatite-coated femoral stems. Histology and histomorphometry around five components retrieved at post mortem. J Bone Joint Surg Br. 1999 Jan;81(1):148-54.
 171. Sahin S1, Akagawa Y, Wadamoto M, Sato Y. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant. II: A morphometric evaluation after three months of loading. J Prosthet Dent. 1996 Aug;76(2):176-80.
 172. Sul YT1, Johansson CB, Kang Y, Jeon DG, Albrektsson T. Bone reactions to oxidized titanium implants with electrochemical anion sulphuric acid and

phosphoric acid incorporation. Clin Implant Dent Relat Res. 2000

173. Wadamoto M1, Akagawa Y, Sato Y, Kubo T. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant. I: A morphometric evaluation in initial healing. J Prosthet Dent. 1996 Aug;76(2):170-5.
174. Romanos GE1, Ciornei G, Jucan A, Malmstrom H, Gupta B. In vitro assessment of primary stability of Straumann® implant designs. Clin Implant Dent Relat Res. 2014 Feb;16(1):89-95.
175. Bornstein MM, Hart CN, Halbritter SA, Morton D, Buser D. Early loading of nonsubmerged titanium implants with a chemically modified sand-blasted and acid-etched surface: 6-month results of a prospective case series study in the posterior mandible focusing on peri-implant crestal bone changes and implant stability quotient (ISQ) values. Clin Implant Dent Relat Res 2009;11(4):338-347
176. Bornstein MM1, Valderrama P, Jones AA, Wilson TG, Seibl R, Cochran DL. Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces: a histomorphometric study in canine mandibles. Clin Oral Implants Res. 2008 Mar;19(3):233-41.